

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



Efecto de la exposición crónica a dosis subletal de endosulfán sobre la expresión de citocinas IL-6, IL-10 y TNF- α y cambios histopatológicos en modelo murino de cáncer de colon.

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO en BIOLOGÍA

Presenta
RUBIO CHÁVEZ LIDIA ARIADNA

Directora
Dra. Galina Petrovna Zaitseva

Asesora
Dra. Marta Cecilia Téllez Bañuelos

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Enero 2015

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de la autora y su director de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Agradecer hoy y siempre a mi familia porque, sé que procuran mi bienestar y está claro que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mis estudios no hubiesen sido posible. A mis padres David Rubio y Sara Chávez; hermanos, abuelos y tíos. Porque a pesar de la distancia, el ánimo, apoyo y alegría que me brindan me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

Un agradecimiento especial al Director de tesis Dra. Galina Petrovna por la colaboración, paciencia, apoyo brindados desde siempre y sobre todo por esa gran amistad que me brindó y me brinda, por escucharme y aconsejarme siempre.

A mi asesora de tesis Dra. Marta Cecilia Téllez Bañuelos por la colaboración brindada durante toda la tesis y sobre todo en ésta última etapa.

Igualmente agradecer de manera especial al Dr. Jorge Peregrina Sandoval, Dra. Josefina Casas Solís y Dr. Eduardo Flores Torales, quienes tuvieron a bien revisar y corregir esta tesis y participar en la misma como sinodal

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

Índice General

ANTECEDENTES	7
<i>El endosulfán</i>	7
<i>Riesgos para la salud por endosulfán en organismos no blanco</i>	9
<i>Endosulfán y respuesta inmune</i>	9
<i>Cáncer de colon</i>	11
<i>Carcinógeno 1,2- dimetilhidrazina (DMH)</i>	13
<i>Histopatología del cáncer de colon</i>	14
<i>Sistema inmune y cáncer de colon</i>	16
<i>Características de las citocinas IL-6, IL-10 Y TNF-α</i>	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	25
<i>Objetivos particulares</i>	25
MATERIALES Y MÉTODOS	28
<i>Animales experimentales</i>	28
<i>Aspectos éticos</i>	28
<i>Preparación y administración de 1,2-dimetilhidrazina (DMH)</i>	28
<i>Preparación y administración de endosulfán</i>	29
<i>Formación de grupos experimentales</i>	30
<i>Toma de muestra (sangre y tejido)</i>	31
<i>Procesamiento de ELISA</i>	32
<i>Procesamiento de los tejidos</i>	32
RESULTADOS.....	35
<i>Inducción de cáncer de colon (CC) con DMH en ratones BALB/C</i>	35
<i>Evaluación de cambios histológicos en colon distal de ratones expuestos a endosulfán</i>	36
<i>Determinación de los niveles séricos de IL-6, IL-10 Y TNF-α en grupos ratones BALB/C expuestos a endosulfán y DMH</i>	50
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA	59

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química del endosulfan	8
Figura 2. Funciones de las células T reguladoras en el cáncer.....	17
Figura 3. Respuesta inmune celular contra el tumor	18
Figura 4. Estructura de IL-6.....	19
Figura 5. Estructura de TNF-alfa.....	20
Figura 6. Estructura de IL-10.....	21
Figura 7. Procesamiento histológico esquematizado	34
Figura 8. Microfotografías de colon con DMH	36
Figura 9. Microfotografías de colon semana 1	37
Figura 10. Microfotografías de colon semana 5	38
Figura 11. Microfotografías de colon semana 7	39
Figura 12. Microfotografías de colon semana 12	40
Figura 13. Microfotografías de colon semana 12	41
Figura 14. Microfotografías de colon semana 24	42
Figura 15. Microfotografías de colon semana 30	43
Figura 16. Microfotografías de colon semana 30	43
Figura 17. Microfotografías de colon semana 35	45
Figura 18. Microfotografías de colon semana 41	46
Figura 19. Microfotografías de colon semana 41	47
Figura 20. Microfotografías de bazo.....	48
Figura 21. Microfotografías de hígado.....	49
Figura 22. Microfotografías de hígado semana 52.....	49
Figura 23. Niveles séricos de IL-6.....	50
Figura 24. Niveles séricos de IL-10	52
Figura 25. Niveles séricos de TNF-alfa	51

ANTECEDENTES

México es un país con una importante actividad agrícola que requiere el uso constante de plaguicidas para combatir los insectos, arañas, moluscos y otras plagas de invertebrados e incrementar el rendimiento de las cosechas. Sin embargo, hay pruebas que demuestran los efectos nocivos de plaguicidas sobre organismos *no blanco* (vertebrados como peces, anfibios, aves y mamíferos), incluyendo humanos, que se presentan en intoxicaciones agudas y crónicas con manifestaciones a mediano o largo plazo, por ejemplo carcinogénesis y mutagénesis, entre otros (Walter, 2000; Rivero *et al.* 2001).

Los plaguicidas según su composición química se clasifican en varios grupos, Arsenicales, Carbamatos, Derivados de cumarina, Derivados de urea, Dinitrocompuestos, Organoclorados, Organofosforados, Organometálicos, Piretroides, Tiocarbamatos, Triazinas (Bartual y Berenguer, 1998). Los primeros en ser usados en agricultura fueron los órgano clorados (OC), que son más persistentes en medio y más tóxicos. Aun así su uso es muy amplio en América Latina y solo está restringido en pocos países. Tan sólo en 2004 en nuestro país se vendieron 492 mil 147 kilogramos de un plaguicida OC endosulfán, cifra que lo convierte en el plaguicida más vendido (INEGI, 2004). Su aplicación está autorizada en México desde la década de los setenta (Bejarano, 2008) y aun recientemente se reporta su uso extenso e intenso del mismo (Wong *et al.* 2010). A pesar de ello, hay pocos estudios sobre sus efectos en la salud.

El endosulfán

El endosulfán (número de registro CAS 115-29-7) es un insecticida órgano clorado del grupo de los ciclodienos, desarrollado pocos años después de la Segunda Guerra Mundial para el control de insectos (figura 1). Éste producto es una mezcla de los isómeros α - endosulfán (CAS 959-98-8) y β - endosulfán (CAS 33213-65-9) con una relación 7:3 respectivamente. El endosulfán elimina plagas de insectos de las órdenes Lepidoptera, Coleóptera, Heteróptera, Homóptera y Thysanóptera que

atacan cultivos de cítricos, oleaginosos y verduras. También es aplicado en plantas ornamentales y como conservador de madera contra termitas (Yunquan *et al.* 2000). Además, tiene la propiedad de desplazarse a largas distancias del sitio aplicado por su fácil y rápida evaporación.

Este insecticida se considera persistente en el medio ambiente ya que tiene una vida media de 28 a 391 días en suelo y de 18 a 21 días en agua. Actualmente es examinado en el Convenio de Rotterdam con la finalidad de aplicar normas más estrictas en su comercialización internacional, así como en el Convenio de Estocolmo para su prohibición internacional, debido a sus efectos adversos en la salud (UNEP, 2009). Aunque no hay información de acceso público que nos permita saber la cantidad exacta de endosulfán que se aplica en México en día de hoy, es posible afirmar que las importaciones de este insecticida han ido en aumento: de 119 toneladas (t) en el 2002 a 731 t en el 2006, provenientes principalmente de Israel (43%); de India (40%) y de Alemania (17%), considerando el volumen durante el período de enero del 2002 a junio del 2007, alcanzando un total de 12,657 toneladas (Bejarano *et al.* 2008). Se autoriza su aplicación en 41 tipo de cultivos que incluyen gramíneas, vegetales, frutas cítricas y leguminosas (Fernández e Yarto, 2004).

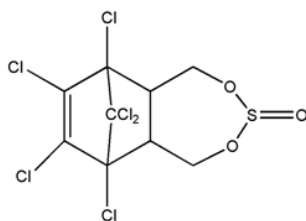


Figura 1. Estructura química del endosulfán (tomado de Ledirac et al. 2005)

En insectos el principal blanco del endosulfán es el sistema nervioso central a través de la inhibición del canal clorinado del ácido gamma amino butírico (GABA), lo que provoca hiperexcitabilidad de neuronas motoras, espasmo de músculos del tracto respiratorio y muerte por asfixia. En otros organismos el endosulfán tiene varios mecanismos de acción tóxica (Casida and Quistad, 2004).

Riesgos para la salud por endosulfán en organismos *no blanco*

El principal mecanismo de toxicidad del endosulfán en vertebrados se ejerce, igual que en los insectos, en el sistema nervioso. Actúa como antagonista del receptor del GABA asociado al canal iónico de cloro, lo que disminuye la captación de iones cloruro, ocasionando una repolarización parcial de la neurona y un estado de excitación incontrolable. Asimismo inhibe Na^+/K^+ y $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ ATPasas, esenciales para la transportación de iones a través de membrana celular, alteran la actividad de la MAP kinasa dependiente de ROS, lo que disminuye el crecimiento y afecta la diferenciación celular (Ligong *et al.* 2006; Antherieu *et al.* 2007).

Los plaguicidas órgano clorados también son disruptores endocrinológicos que actúan como xenoestrogenos mediante unión con los receptores alfa y beta de estrógenos (Wang *et al.* 2008).

Las personas intoxicadas presentan cefalea, náuseas, mareo, convulsiones y signos prodrómicos de cardiopatía. En humanos, la exposición al endosulfán ocurre principalmente por ingestión de alimentos contaminados, inhalación y absorción a través de la piel frecuentemente durante su aplicación, tanto en casa como en áreas de cultivo (Ware *et al.* 2004; UNEP, 2009). Los efectos adversos de endosulfán en la salud son de índole cardiotoxico, endocrinológico, neurotóxico e inmunotóxico (Kalender *et al.* 2004; Schoeters *et al.* 2008; Suñol *et al.* 2008).

Endosulfán y respuesta inmune

El sistema inmune es el compendio de células especializadas, tejidos y órganos linfoides que le dan al organismo la habilidad de reconocer lo propio y defenderlo de lo extraño. La interacción de los xenobioticos, incluyendo a los plaguicidas OC como lo es endosulfan, con el sistema inmune puede alterarlo de dos maneras opuestas: provocar inmunosupresión conduciendo al organismo expuesto a infecciones recurrentes y cáncer; o inducir autoinmunidad e hipersensibilidad

como lo mencionan los estudios de Walter (2000) dependiendo de dosis y tiempo de exposición a estas sustancias. Singh y Sharma (2007) administraron 1mg/kg de endosulfán en alimentos de ratas Wistar durante 15 días reportando una baja del peso y aumento en la apoptosis de los órganos linfoides. Asimismo, Abadin *et al.* (2007) observaron también atrofia de órganos linfoides y disminución de concentración de esplenocitos en ratas expuestas durante 24 semanas a 1.2 mg/kg de endosulfan.

A su vez, Ayub y Thale (2003) reportaron una reducción significativa de TNF- α en macrófagos peritoneales de murino expuestos *in vitro* a concentraciones de 10 y 20 mg/mL de endosulfán por 24 horas, sin observar algún efecto significativo en la síntesis de óxido nítrico ni en la lipoperoxidación lipídica. Sin embargo, en un estudio *in vitro* Han *et al.* (2007) observaron en macrófagos peritoneales de murino expuestos a concentraciones bajas de endosulfan (1,5-10uM) un incremento significativo en la producción de interleucinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF-alfa.

La exposición *in vivo de tilapia* a concentraciones bajas (7 μ g/L) de endosulfán mostró alteraciones de la inmunidad innata (incremento de producción de especies oxidorreactivas por macrófagos esplénicos) y específica (alteraciones en síntesis de IL-2 e IgM específica contra *Aeromonas hydrofila*) en tilapia *Oreochromis niloticus*, además el endosulfán *in vitro* disminuyó la proliferación de esplenocitos de tilapia bajo estímulo mitogénico y demostró el efecto antiapoptótico e incrementó la senescencia en células inmunocompetentes (Téllez-Bañuelos *et al.* 2009; Téllez-Bañuelos *et al.* 2010; Téllez-Bañuelos *et al.* 2011).

Se ha observado una relación causal entre la exposición a pesticidas órgano clorados y el aumento en la incidencia del cáncer: un estudio piloto en Egipto en pacientes con cáncer colorrectal mostró una relación entre el riesgo de la enfermedad y los niveles de órgano clorados en su suero (Soliman *et al.* 1997).

Así mismo, un estudio hecho a los agricultores en Estados Unidos se asoció a los pesticidas órgano clorados con una mayor incidencia de linfoma no Hodgkin (Roos *et al.* 2003). En pacientes con cáncer de colon en Barcelona, España observaron una relación moderada entre la incidencia de este padecimiento y presencia del dichloro-diphenyl-dichloro-ethylen (un metabolito de DDT) en suero de estos pacientes, también hubo un aumento significativo en el riesgo de tumores relacionado con mutaciones del gen p53 (Howsam *et al.* 2004).

El endosulfán, siendo un plaguicida órgano clorado, puede tener un efecto cancerígeno a través del cambio en los parámetros electrónicos en las membranas celulares y nucleares, debido a su afinidad por electrones, su molécula dipolar y su afinidad electrostática, alterando con facilidad la permeabilidad de la membrana celular; por lo que el uso de este insecticida representa un riesgo para la salud de la población, especialmente para los trabajadores rurales expuestos con frecuencia (Bedor *et al.* 2010).

Aunque no se tienen datos que relacionen de manera directa el endosulfán como carcinógeno en humanos u otros organismos, existe evidencia de que tiene el efecto antiapoptótico y puede inducir a la proliferación celular, aumentando el riesgo de cáncer (Ledirac *et al.* 2005).

Describimos a continuación el cáncer de colón, debido a que hemos estudiado el efecto de endosulfan en un modelo de este tipo de cáncer.

Cáncer de colon

Una neoplasia (o tumor) es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento excesivo y no controlado y la propagación de células estructural y biológicamente anormalmente diferenciadas que pueden proceder de cualquier tejido del cuerpo (Tanaka, 2009).

El cáncer colorrectal (**CCR**) es una neoplasia que se inicia en la mucosa del recto o del colon y que se presenta histológicamente como un **adenocarcinoma**. Estos evolucionan desde pólipos que pueden estar presentes 10 años antes de desarrollarse la malignización de la enfermedad. La mayoría de los pacientes presentan síntomas claros durante semanas o meses antes de la hospitalización, pero generalmente se diagnostica el CCR en fases avanzadas de la enfermedad. Los síntomas más comunes son: sangrado rectal, cambios persistentes en los hábitos intestinales y anemia. En tumores avanzados se produce pérdida de peso, náuseas, anorexia y dolor abdominal. Los síntomas precoces pueden ser poco severos y, frecuentemente, no bien definidos. En algunos pacientes los síntomas aparecen únicamente cuando el cáncer se encuentra en una fase avanzada (Ocaña y Gassó, 2011)

Según el INEGI (2013), el CCR es el séptimo carcinoma más frecuente en egresos hospitalarios en México en el 2013, donde Jalisco ocupa el séptimo lugar a nivel nacional en incidencias de esta enfermedad. El CCR es un importante problema de salud pública ya que representa una mortalidad anual mundial de 694 mil (OMS, 2010). La etiología de este tipo de cáncer es multifactorial que involucra factores genéticos y ambientales.

La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas en el desarrollo de neoplasias malignas en el que se han identificado los siguientes tres estadios:

a) **Iniciación:** Un cambio permanente y heredable que altera el DNA, molécula en la cual los múgatenos inducen mutaciones y con ello se altera la regulación de la expresión de algunos genes importantes para la célula.

b) **Promoción:** Un proceso reversible en el cual se acumulan otras alteraciones genéticas.

c) **Progresión:** Cuando las células genéticamente alteradas perpetúan su crecimiento y proliferación, invaden los tejidos adyacentes y debido a metástasis

migran hacia otras partes del organismo, lo que finalmente se traduce en el desarrollo del cáncer invasivo (Granados y Herrera, 2010).

Para comprender mejor el desarrollo de CCR se ha estudiado este fenómeno en modelos animales de laboratorio, más utilizado es la inducción de CCR con el carcinógeno 1,2- dimetilhidrazina.

Carcinógeno 1,2- dimetilhidrazina (DMH)

El DMH es uno de los químicos más efectivos en la inducción del cáncer de colon ya que presenta una eficiencia del 80 a 100 por ciento dependiendo del modelo experimental. Este compuesto es un procarcinógeno que requiere de activación metabólica para formar el carcinógeno activo. Dicha activación incluye primeramente la oxidación a azometano (AM), seguido por una oxidación que convierte el azometano a azoximetano (AOM), el cual es N-hidroxilado a metilazoximetanol (MAM).

El MAM es descompuesto en formaldehído, agua y nitrógeno. Durante esta descomposición se forma un agente alquilante, el metildiazonio (MD), el cual genera un ión carbónico capaz de metilar al DNA, RNA y proteínas (Nagasawa *et al.* 1972). Estudios radiográficos utilizando DMH muestran que este agente es captado por el hígado aproximadamente una hora después de su inyección subcutánea, en las células epiteliales del colon tres horas después de la misma (Newberne y Rogers, 1973).

Describimos un poco la histología del colon con finalidad de abordar posteriormente cambios en el mismo después de exposición a cancerígenos y a endosulfan.

Histología del colon

El colon carece de vellosidades, pero contiene criptas de Lieberkühn en abundancia cuya composición es similar a las del intestino delgado, excepto por la ausencia de células de Paneth.

La cifra de células caliciformes se incrementa del ciego al colon sigmoide, pero las células de absorción de la superficie son el tipo celular más numeroso. La actividad mitótica rápida de las células de regeneración reemplaza el revestimiento epitelial de las criptas y la superficie mucosa cada seis a siete días. La muscular externa es poco común porque la capa longitudinal externa no se continúa en toda su superficie (Gartner y Hiatt, 2002).

Histopatología del cáncer de colon

El tumor maligno más frecuente en el intestino grueso es el adenocarcinoma. Se dividen según el grado de diferenciación fundamentalmente con base a la arquitectura, la configuración tubular y el grado de polaridad nuclear en adenocarcinomas bien diferenciados, moderadamente diferenciados y poco diferenciados.

Los **adenocarcinomas bien diferenciados** presentan túbulos simples o complejos con aspecto pseudocriptiforme, las células suelen mantener cierta polaridad con los núcleos basales y son de tamaño uniforme. Los **adenocarcinomas moderadamente diferenciados** muestran túbulos simples, complejos o ligeramente irregulares, cuya polaridad nuclear se pierde o es difícilmente identificable. Los **adenocarcinomas poco diferenciados** se caracterizan por la presencia de glándulas irregulares o ausencia de su formación, con pérdida de polaridad nuclear. Con base en estos criterios, el 15-20 por ciento de los adenocarcinomas son bien diferenciados, el 60-70 por ciento moderadamente diferenciado y el 15-20 por ciento poco diferenciado (Piñols, 1999).

Focos de Criptas aberrantes

Los Focos de Criptas Aberrantes (FCA) son considerados lesiones preneoplásicas en ratones y en seres humanos, fueron identificados y definidos por su apariencia microscópica en la mucosa colónica. Las criptas son aberrantes por presentan las siguientes características:

1. Son más alargadas de lo normal.
2. Tienen espacio pericriptico aumentado, lo que hace que se vean más separadas de las criptas normales.
3. Tienen una capa más gruesa de células epiteliales, que a menudo se tiñen más oscuras.
4. Generalmente tienen un lumen oval más que circular.
5. Frecuentemente se aprecian elevadas sobre la mucosa, pero también pueden ser deprimidas.

Se consideran criptas como FCA, si por lo menos reúnen cuatro de los cinco criterios (Leon y Sáenz, 2007).

FCA sin displasia

Los FCA con mucosa normal no presenta alteraciones en el epitelio que reviste a las criptas, el único dato morfológico es el aumento de las criptas (1.5 veces más grandes de lo normal), pero no existe aumento en el número. Los FCA tienen un aspecto histológico similar a los pólipos hiperplásicos, con elongación de las criptas, bifurcaciones apicales, apertura luminal de aspecto aserrado y son discretamente más elevados que la mucosa adyacente (Cheng y Lai, 2003).

FCA con displasia

Tanto las criptas como las células que las constituyen muestran alteraciones. Las criptas se observan alargadas y aumentadas en tamaño, el epitelio que las reviste presenta estratificación con pérdida de la polaridad, agrandamiento nuclear e

hipercromasía, así como disminución en la mucoproducción en la figura 3, C, D. en comparación con las criptas hiperplásicas (figura 3, A y B).

Histológicamente, los FCA mixtos muestran la combinación en diferentes proporciones de un componente adenomatoso con displasia y otro de tipo hiperplásico sin displasia (Cheng y Lai, 2003).

Sistema inmune y cáncer de colon

El sistema inmune es el encargado de la protección del organismo por medio de la identificación y eliminación de agentes patógenos, así como moléculas o células que las reconozcan como un peligro para el organismo. La respuesta inmune comprende varias proteínas, células, tejidos y órganos que interactúan en una red elaborada y dinámica. Esta respuesta incluye la capacidad de adaptarse para así reconocer patógenos concretos en forma más eficiente. El proceso de adaptación crea memorias inmunológicas y permite brindar una protección más efectiva durante futuros encuentros con estos patógenos (Abbas, 2008).

La vigilancia inmunitaria es un término dado para las funciones fisiológicas del sistema inmunitario para reconocer y destruir clones de células transformadas antes de que se conviertan en tumores. El desarrollo tumoral se interpreta desde el punto de vista inmunológico como un mecanismo de escape de la inmunovigilancia, donde juega un papel importante la tolerancia anormal de células neoplásicas orquestada principalmente por las células T reguladoras como se aprecia en figura 2 (Litman *et al.* 2005).

Por otra parte, el tejido neoplásico parece estar dotado de escaso poder inmunogénico por presentar muchos fragmentos antigénicos derivados de la propia célula. No obstante se detecta en los tumores una proporción variable de infiltración linfocitaria y el CCR es un ejemplo de tumor con notable infiltración por linfocitos. Algunos autores asocian la infiltración de linfocitos en tumor con un pronóstico benigno, sin embargo, otros los relacionan con la diseminación y metástasis.

La participación de determinadas citocinas (también denominadas citoquinas) en la defensa inmunológica frente a la aparición de tumores y su extensión, es objeto de múltiples estudios encaminados a conocer el mecanismo básico de la respuesta inmune para desarrollar un tratamiento inmunológico eficaz (Caro-Patón, 2005).

El papel primordial en la respuesta inmune antitumoral se atribuye principalmente a las células T citotóxicas y las células Natural Killer (NK) (figura 3). La activación de esta estirpe linfocitaria está determinada fundamentalmente por distintas citocinas, entre las que juegan un papel especialmente importante las Interleucina-2 (IL-2) e Interleucina-12 (IL-12).

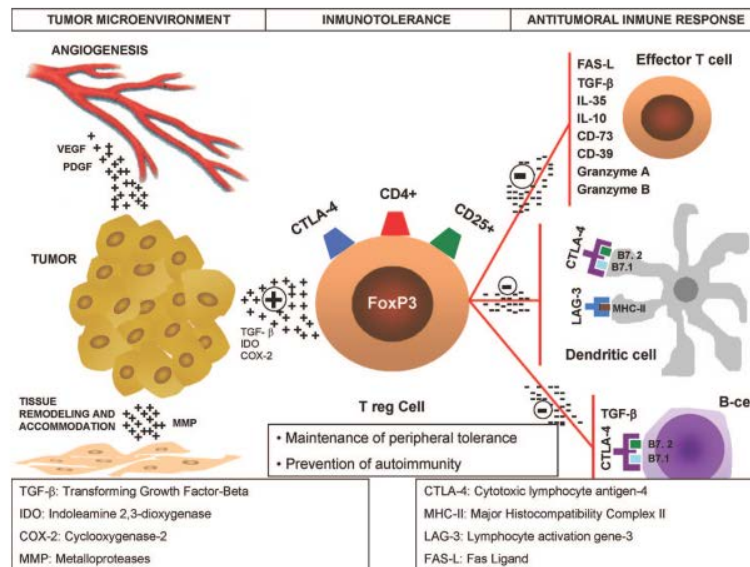


Figura 2. Funciones de las células T reguladoras en el cáncer (tomado de la Cruz-Merino *et al.* 2008)

La interleucina-10 (IL-10) se ve incrementada junto con otras interleucinas por las células T-reguladoras, ésta Interleucina tiene un efecto represor de la actividad de las respuestas inmune innata y adaptativa. Por otro lado, la interleucina-2 (IL-2) induce una reacción macrófagica con necrosis tumoral de carcinomas. La interleucina-12 (IL-12) ejerce una protección frente a metástasis de CCR ya que promueve la proliferación y activación antineoplásica de células NK y T citotóxicas (Caro-Patón, 2005).

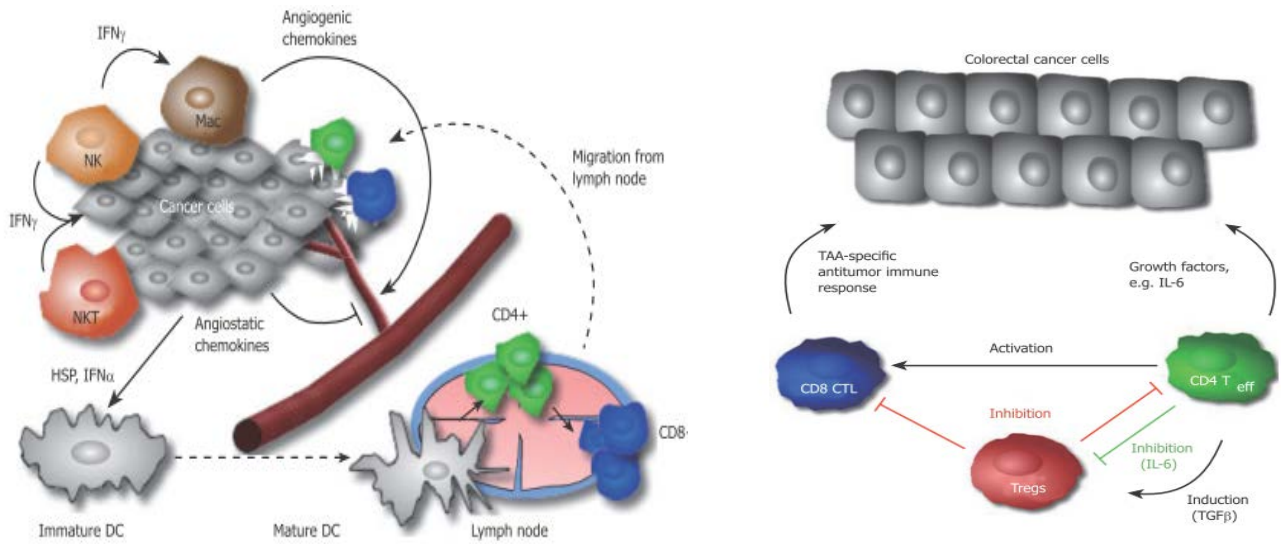


Figura 3. Respuesta inmune celular contra el tumor (tomado de Waldner *et al.* 2006).

Interferón gama (IFN γ) es una citocina que juega un papel importante en la activación y reclutamiento de macrófagos así como en la estimulación de células NK, que puedan eliminar células tumorales.

Describimos con más detalle tres de los principales interleucinas proinflamatorias.

Características de las citocinas IL-6, IL-10 Y TNF- α

Las citocinas son proteínas secretadas por las células inmunocompetentes con funciones de factores de crecimiento, diferenciación y activación celular que regulan la naturaleza de la respuesta inmune. Están involucradas en casi cada faceta de la inmunidad y reacciones de inflamación desde la sensibilización de linfocitos T hasta el desarrollo de anticuerpos (Ac). Su acción fundamental es la regulación de la inflamación, hay citocinas pro-inflamatorias y otras anti-inflamatorias (Méndez, 2008).

IL-6

En 1976 se describió por primera vez un factor biológico que no induce la formación de colonias pero estimula la diferenciación terminal de células

mieloides a macrófago-granulocitos, este factor se llamó interleucina 6. Tiene una longitud de 5 kb constituida por 5 exones, precursor proteico es de 212 aminoácidos y el fragmento biológicamente activo es de 185 aminoácidos (figura 4); se encuentra en el cromosoma 7. Guarda una homología de secuencia de nucleótidos con G-CSF (factor de crecimiento de colonias de granulocitos) lo que sugiere un parentesco evolutivo entre ambos. Además, se produce por una multitud de células: linfocitos T, monocitos/macrófagos, células endoteliales, linfocitos B, granulocitos, células de músculo liso, eosinófilos, condrocitos, osteoblastos, células mastoides, células de la glía y astrocitos y queratinocitos estimulados. La expresión de IL-6 se regula positivamente por la IL-1, así como por el TNF- α ; de esta manera, IL-6 inhibe la producción y secreción de IL-1 y TNF- α , de tal forma que IL-6 es considerada como un mediador importante de las reacciones de fase aguda. Su efecto más importantes es la inducción de fiebre por ser excelente pirógeno y activar la síntesis de proteínas de fase aguda. También estimula el crecimiento y diferenciación de tanto linfocitos T como linfocitos B. (Cáceres, 1999)

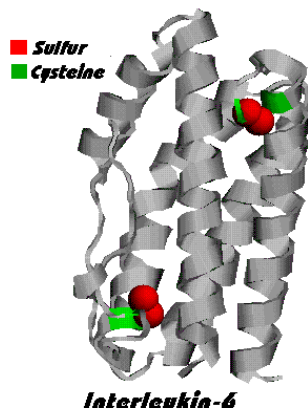


Figura 4. Estructura de IL-6 (tomada de Ames, 2012)

TNF-alfa

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) es una citocina potente proinflamatoria y clásica en respuesta contra el tumor. Proteína no glucosilada que está formada por 157 aminoácidos (figura 5) localizados en el gen de la región III del MHC, del cromosoma 6. Los macrófagos son las principales células que los producen, también es sintetizado por linfocitos B y NK. Para que el TNF-alfa pueda funcionar necesita como cualquier otra citocina unirse a su receptor específico (TNFR) sobre

la membrana de una célula. La principal acción sistémica del TNF es actuar sobre el hipotálamo para inducir fiebre (pirógeno endógeno). La fiebre en respuesta al TNF (e IL-1, IL-6) se debe a un aumento en la síntesis de prostaglandinas por las células hipotalámicas estimulada por la citocina, el TNF también actúa sobre los hepatocitos para aumentar la síntesis de ciertas proteínas séricas, como la proteína C reactiva y el fibrinógeno. La síntesis prolongada de TNF provoca una pérdida de células musculares y adiposas (Weinberg, 2006).



Figura 5. Estructura de TNF-alfa (tomada de Carson, 2011)

IL-10

Llamada antes factor inhibidor de la síntesis de citocinas proinflamatorias; proteína con masa molecular de 18 KDa (figura 6), producida por células Th2 y células T CD8, monocitos, queratinocitos y células B activadas. Inhibidor de macrófagos y células dendríticas activadas, por lo tanto participa en el control de reacciones inmunitarias innatas e inmunidad celular y expresión de moléculas del MHC clase II. La IL-10 es una citocina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la síntesis de muchas otras citocinas, entre las que podemos citar IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-12, y la expresión de MHC-II y moléculas de adhesión en monocitos. Esta IL-10 actúa sobre los macrófagos activados para poner fin a la respuesta inflamatoria y devolver el sistema a su estado de reposo cuando la infección de microorganismos se ha erradicado (Girndt, 2003).



Figura 6. Estructura de IL-10 (tomada de Zdanov *et al.* 1995)

Estudios han demostrado la relación que existe entre las tres citocinas citadas anteriormente en el desarrollo de cáncer de colon. Los datos indican un papel importante para IL-10 en la supresión de reacciones inmunes e inflamatorias. Hasta la fecha, la expresión de IL-10 en humanos se ha atribuido principalmente a los linfocitos T, monocitos activados y células neoplásicas B, y se encontró a menudo que se asocia con la expresión de IL-6. La expresión de IL-6 y IL-10 se confirmó por análisis de ARN mediante la amplificación de mensaje por PCR y secuenciación de ADNc amplificado. TNF- α está fuertemente reforzada por la liberación de IL-6 por las células RCC, pero sólo marginalmente afectados por IL-10 en la producción de células en carcinoma de colon (Gastl *et al.* 1993).

Los interleucinas se determinan por diferentes métodos, el más usado es ELISA, siglas con las que se conoce al ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés enzyme-linked immunosorbent assay). Se trata de una técnica de laboratorio que fue diseñada por científicos suecos y holandeses en 1971, son ensayos basados en placas que contienen anticuerpos o antígenos para detectar y cuantificar sustancias tales como péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas. En un ELISA, un antígeno debe ser inmovilizado a una superficie sólida y luego un complejo con un anticuerpo que está unido a una enzima. La detección se lleva a cabo mediante la evaluación de la actividad de la enzima conjugada a través de la incubación con un sustrato para producir un producto medible. El elemento más importante de la estrategia de detección es una interacción altamente específica

antígeno-anticuerpo (Thermo Scientific, 2014). Este método utilizamos para la determinación de interleucinas en el suero de ratones expuestos a endosulfán.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El endosulfán es un insecticida órgano clorado que se utiliza ampliamente en la agricultura en México y que representa un riesgo para la salud de organismos *no blanco*. Existen estudios que reportan su efecto inmunotóxico, inducción de TNF- α e IL-6 *in vitro* y otros que relacionan el uso de endosulfan con el incremento en la incidencia de cáncer. Asimismo, los datos de nuestro laboratorio muestran alteración de parámetros inmunológicos como linfoproliferación, actividad fagocítica y citolítica de NCC en tilapia expuesta a endosulfán *in vivo*, lo que puede facilitar el desarrollo de tumores.

A pesar de esto, se desconoce el efecto del endosulfán en exposición crónica en concentraciones bajas sobre síntesis de intrerleucinas *in vivo*, así como en el desarrollo de cáncer en mamíferos. Por lo que, el presente trabajo propone determinar los niveles de interleucinas pro y antiinflamatorias séricas en ratones BALB/C con administración de dosis subletal de este plaguicida, así como valorar su efecto en la evolución de cáncer de colon murino inducido con 1,2-dimetilhidrazina por los cambios histopatológicos en colon.

HIPÓTESIS

La exposición crónica a dosis subletal de endosulfán acelera el desarrollo de cáncer de colon murino inducido con DMH a través de aumento en producción de interleucinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α y disminución de interleucina anti-inflamatoria IL-10.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la exposición crónica a dosis subletal de endosulfán sobre la expresión de citocinas séricas IL-6, IL-10 y TNF- α y cambios histopatológicos en un modelo murino de cáncer de colon.

Objetivos particulares

1. Inducir el cáncer de colon en ratones BALB/C con DMH
2. Valorar cambios histopatológicos en colon de ratones en estudio.
3. Cuantificar los niveles séricos de citocinas IL-6, IL-10 y TNF- α en ratones BALB/C expuestos y no expuestos a endosulfán y DMH.

4. Diseño experimental

Tipo de estudio

Experimental

Universo de Estudio

Ratones hembras y machos de la cepa BALB/C con un peso aproximado de 20g.

Variables

Independientes

Thiodan (endosulfán comercial)

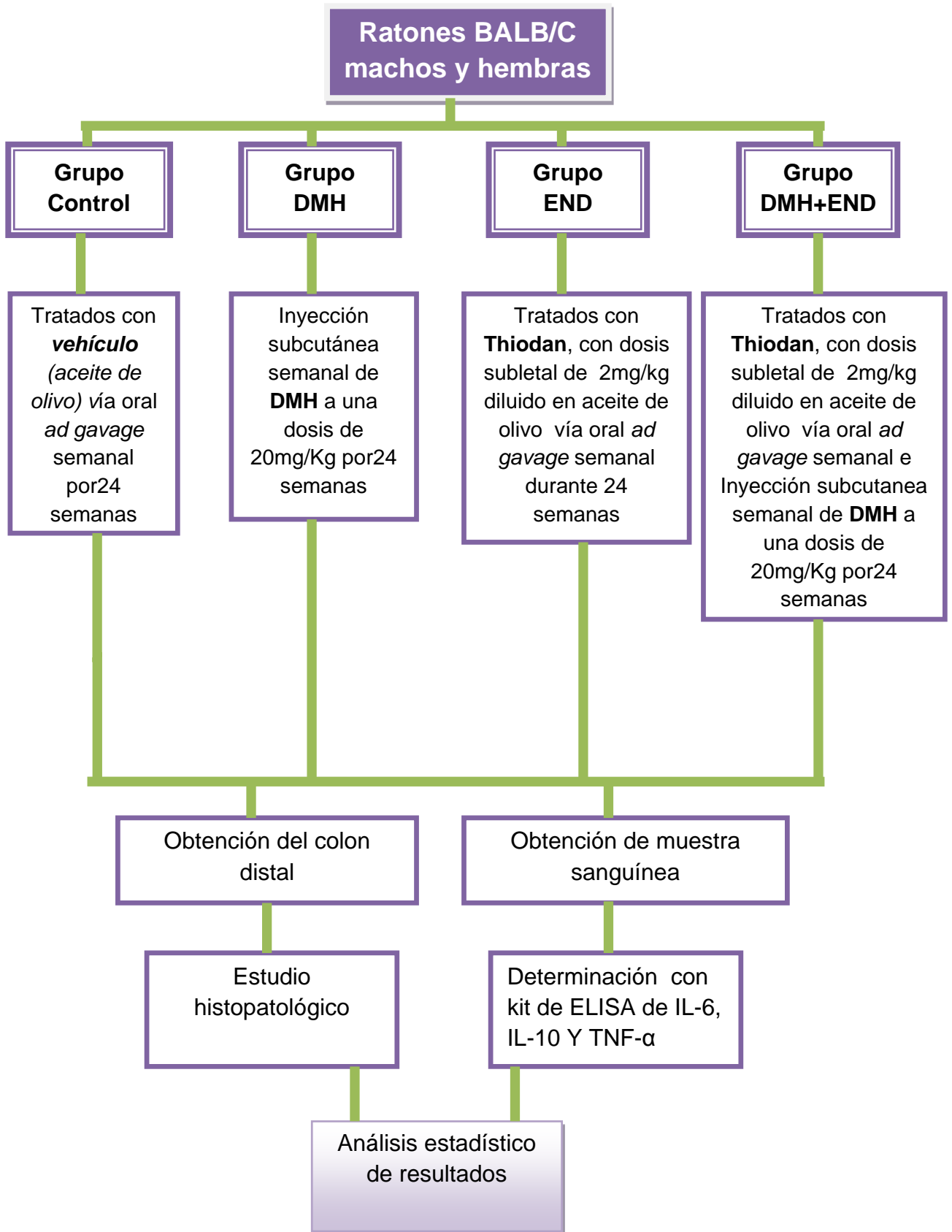
1,2- dimetilhidrazina

Dependientes

Cambios en cortes histológicos de colon (grado de inflamación y aparición de criptas aberrantes)

Niveles séricos de interleucinas IL-6, IL-10 y TNF-alfa

Diagrama de diseño experimental



MATERIALES Y MÉTODOS

Animales experimentales

Los ratones hembras y machos de la cepa BALB/C con un peso aproximado de 20g, fueron alojados en cajas de policarbonato con temperatura controlada de 22 a 24 °C y fotoperiodos de luz-oscuridad de 12 horas; alimentados con una dieta balanceada para roedores (Purina-México) y agua a consumo voluntario (*ad libitum*) en condiciones de bioterio del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA).

Aspectos éticos

Los animales fueron manipulados de acuerdo a la guía y cuidado de los animales experimentales y a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 publicada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en el Diario Oficial del Gobierno Mexicano.

Preparación y administración de 1,2-dimetilhidrazina (DMH)

El DMH (Sigma) se disolvió en solución estéril de EDTA (ácido etilendiaminotetracético) 1mM ajustando a un pH de 6.5 con hidróxido de sodio. El DMH se preparó calculando 20mg/kg del peso del ratón inmediatamente antes de ser administrado y se ajustó a la concentración deseada. La inyección subcutánea se realizó en la parte ventral del animal utilizando una jeringa de insulina con un volumen constante de 200µL.

Para el manejo del DMH, se revisó la hoja de seguridad, se utilizó la medida de precaución (guantes, cubre bocas y bata) y se realizó la administración del cancerígeno a los ratones en campana de extracción.

La dosis de DMH 20mg/Kg fue seleccionado según estudio realizado en el Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA en ratones BALB/C (Cazares A., 2010).

Preparación y administración de endosulfán

El Thiodan (endosulfan comercial) se disolvió en el vehículo (aceite de olivo) se preparó inmediatamente antes de ser administrado y se ajustó a la concentración deseada. Fue administrado vía oral *ad gavage* (a la fuerza) con jeringa de insulina y aguja adaptada para su aplicación.

Para el manejo del endosulfan (EDN), se revisó la hoja de seguridad, se utilizó la medida de precaución (guantes, cubre bocas y bata) y se realizó la administración del plaguicida en campana de extracción. Para la neutralización de endosulfan sobrante se utilizó la siguiente manipulación antes de desecharlo: Se inactivó el endosulfán con el hidróxido de sodio al 5 por ciento, dejándolo remojar por 2-3 horas en un lugar abierto. Posteriormente fue enjuagado con agua abundante.

Calculo de preparación de endosulfán

1L de Thiodan, contiene 33.25% de endosulfán

1mL de Thiodan = 1.0815g (peso neto de preparación de plaguicida)

$1.0815\text{g} \times 33.25\% = 0.359\text{g}$ (peso neto de endosulfan puro en 1mL)

1mL = 0.359g = 359mg de endosulfán

Preparación de stock

10 μ L (Thiodan) + 990 μ L (aceite de olivo) = 1mL de stock

10 μ L de stock = 35 μ g de endosulfan

Dosis administrada

2mg de endosulfan por 1kg del peso de ratón es igual que 2000 μ g/1000g

Para un ratón con el peso de 20 g la dosis de endosulfan es 40 μ g equivalente a 11.4 μ L de stock.

11 μ L stock + 89 μ L aceite de olivo por ratón = 100 μ L de preparación para administración oral (cambia un poco según el peso del ratón).

El cálculo de dosis subletal administrada fue basado en el estudio previo de DL₅₀ de endosulfan realizado en el Laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular del CUCBA, el resultado del análisis PROBIT en la determinación de la DL₅₀ oral de endosulfán fue de 11.5 mg/kg en machos y de 8 mg/Kg en hembras (Mendoza *et al.* 2010). A partir de este dato se determinó la dosis subletal a utilizar durante el experimento de 2 mg/Kg para ambos sexos.

Formación de grupos experimentales

Grupo control

Grupo control fue de ratones hembras y machos homogéneos en talla y peso, a los cuales fue aplicado semanalmente solo el vehículo (aceite de olivo) por vía oral durante 24 semanas. Fueron sacrificados periódicamente (semanas 1, 7, 24 y 30).

Grupo con DMH

Grupo experimental de ratones hembras y machos homogéneos en talla y peso, recibieron una inyección subcutánea semanal de DMH durante 24 semanas calculando dosis subletal de 20mg/kg de peso corporal. Fueron sacrificados periódicamente (semanas 7, 12, 24, 30 y 41).

Grupo con endosulfán

Grupo experimental de ratones BALB/C hembras y machos homogéneos en talla y peso fueron tratados con Thiodan (endosulfán comercial) con dosis subletal de 2mg/kg diluido en aceite de olivo, fue administrado semanal en ratones de ambos sexos vía oral *ad gavage* durante 24 semanas. Fueron sacrificados

periódicamente (semanas 1, 5, 7, 12, 24, 30, 35 y 41). Un ratón hembra fue observado y sacrificado hasta semana 52.

Grupo con endosulfán y DMH

Grupo experimental de ratones BALB/C, homogéneos en talla y peso, fue tratado con dosis de 2mg/kg de endosulfan diluido en aceite de olivo, cual fue administrado semanal en ratones de ambos sexos vía oral *ad gavage* durante 24 semanas, además estos ratones recibieron a la par una inyección subcutánea semanal de DMH también durante 24 semanas con la dosis de 20mg/kg de peso corporal. Fueron sacrificados periódicamente (semanas 1, 5, 7, 12, 24, 30 y 41).

El comportamiento de todos los ratones de los cuatro grupos fue observado diariamente. Fueron sacrificados con 0.1 ml de pentobarbital subcutáneo procurando dos ratones de cada grupo experimental con periodicidad descrita anteriormente para cada grupo.

Toma de muestra (sangre y tejido)

Previo al proceso de toma de muestras, los ratones fueron profundamente anestesiados con 0.1 ml pentobarbital (Arandalab) inyectado (dosis aproximada de 50 mg/Kg de peso corporal), lo que los llevaba en unos minutos a la muerte. Inmediatamente se les realizó una toracotomía amplia para exponer el corazón para la toma de sangre directamente al corazón con jeringa de insulina quitando la aguja cada vez que se depositaba la sangre en un vial. Después la sangre fue centrifugada a 1500 rpm durante 15 minutos para extraer el suero y congelarlo hasta el día de la determinación de interleucinas. Luego de la toma de sangre se realizó la disección abdominal para retirar el colon distal de 1 centímetro aproximadamente y colocarlo inmediatamente en un frasco con formol al 10% con finalidad de su posterior procedimiento histológico. En algunos ratones no fue posible extraer la sangre suficiente para tener muestra de suero para ELISA.

Procesamiento de ELISA

Se realizaron las determinaciones de interleucinas de acuerdo a las instrucciones del inserto de cada kit de ELISA de la marca ABCAM.

- Para IL-10: IL-10 Mouse ELISA Kit, numero de catálogo: ab100697, Lot: GR65579-4.

- Para IL-6: IL-6 Mouse ELISA Kit, numero de catálogo: ab100712. Lot: 62462-1.

- Para TNF- α : TNF alpha Mouse ELISA Kit, numero de catálogo: ab100747, Lot: GR69625-1.

Para el análisis de datos de niveles séricos de interleucinas primero se trazó la curva estándar correspondiente a cada kit de ELISA con las concentraciones estandar en el eje de abscisas y la absorbancia en el eje de ordenadas, después se despejo la ecuación que dio la posibilidad de calcular las concentraciones de interleucinas en cada muestra tomando los datos de lector de ELISA con absorbancias determinadas como densidad óptica.

Procesamiento de los tejidos

Fijación

Los tejidos del colon se fijaron y se incluyeron con base en la técnica de Prophet *et al.* 1995. Las fracciones del tejido fueron fijadas en formaldehído al 10 por ciento. El tiempo de fijación fue de 24 horas a temperatura ambiente en frascos herméticos de vidrio.

Inclusión en parafina

Se inició con la deshidratación de los fragmentos de tejidos en etanol con degradación creciente (70,80, 90 y 95 por ciento) y posteriormente dos cambios de etanol absoluto. Una vez deshidratados los tejidos, se aclararon mediante pasos sucesivos en xilol (Baker) para extraer el agente deshidratante. Las muestras fueron sumergidas en sus moldes de metal con parafina que estaban colocados

en una estufa a temperatura de 45°C. En seguida, antes de que se enfriara por completo se colocaron en bloques de parafina.

Cortes

Los cortes de los bloques de parafina con el tejido fueron realizados en micrótopo (MICROM, HM315) de 5µm de espesor; se extendió el tejido con baño de fijación con alcohol al 50 por ciento y se hizo su selección en los porta objetos.

Tinción de los tejidos con hematoxilina-eosina

Los porta objetos se colocaron en cestas de tinción, se desparafinaron en una estufa a 55°C durante 20 minutos y se sumergieron en xilol durante 10 minutos dos veces. Posteriormente las muestras se rehidrataron con concentraciones decrecientes de etanol y tiñeron con hematoxilina y eosina sucesivamente, en seguida se trataron con concentraciones crecientes de etanol hasta el montaje como se muestra a continuación (figura 7).

Las placas montadas fueron examinadas en el microscopio en el Laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular del CUCBA y en la unidad de Patología del Hospital Civil Nuevo de Guadalajara “Dr. Juan I. Menchaca”.

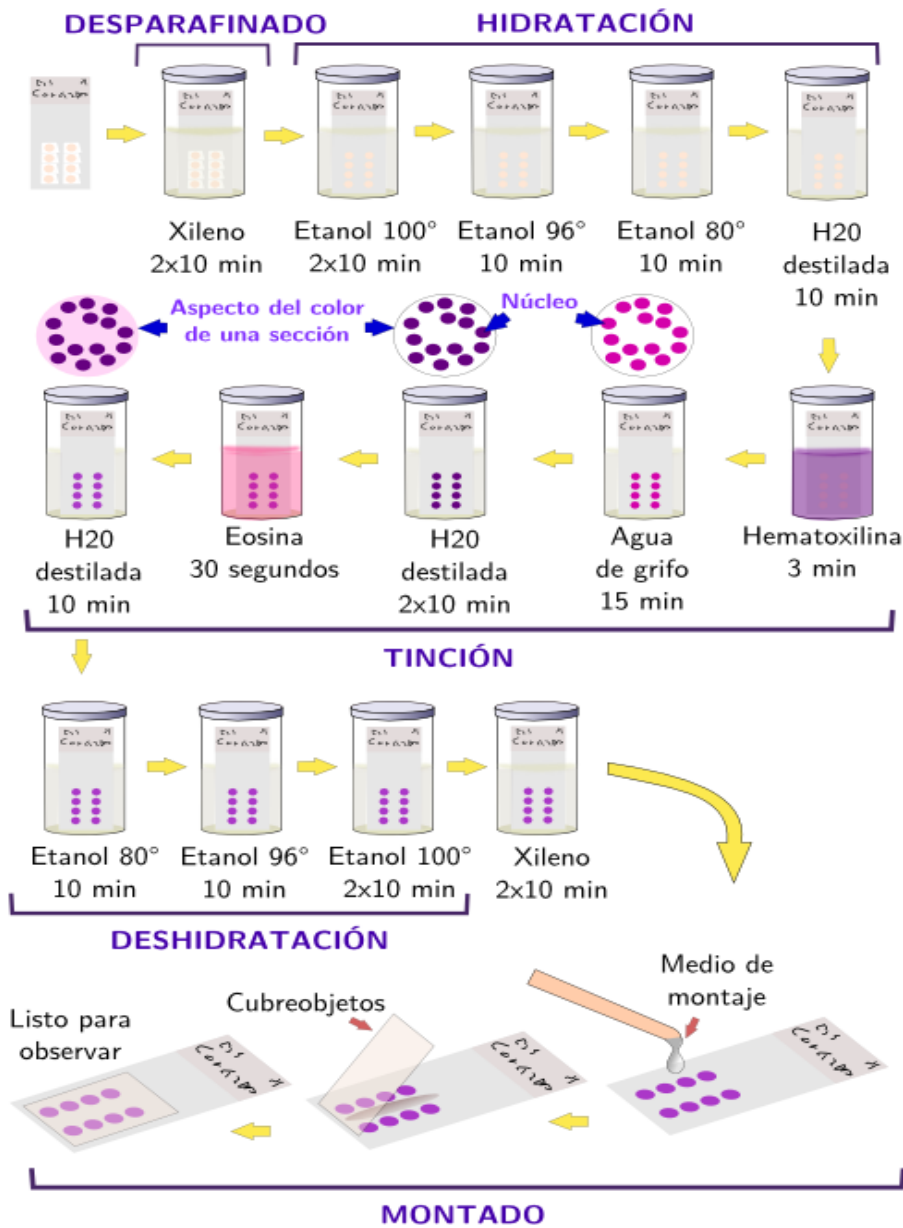


Figura 7. Esquema del procesamiento histológico

RESULTADOS

Inducción de cáncer de colon (CC) con DMH en ratones BALB/C

En un estudio preliminar en las condiciones del bioterio del Departamento de Biología Celular y Molecular se estandarizó el modelo de inducción química de CC y se establecieron los tiempos de sacrificio de los ratones (Cazares A., 2010; Irecta C., 2013), en los cuales se basó nuestro estudio.

El estudio histopatológico de todos los grupos de estudio fue avalado por el Jefe de Patología del Hospital Civil Nuevo de Guadalajara “Dr. Juan I. Menchaca”, el Dr. en C. Ramón Antonio Franco Topete.

Los cambios histológicos se evaluaron en las semanas 7, 12, 24, 30 y 41 como se muestra en la figura 8. En la semana 7 se observa inflamación leve, en la semana 12 observamos inflamación crónica agudizada. Se confirmó que el DMH induce lesiones preneoplásicas como criptas aberrantes en la semana 24 desde el inicio de administración de este cancerígeno, adenocarcinoma *in situ* en la semana 30 y cáncer de colon en la semana 41.

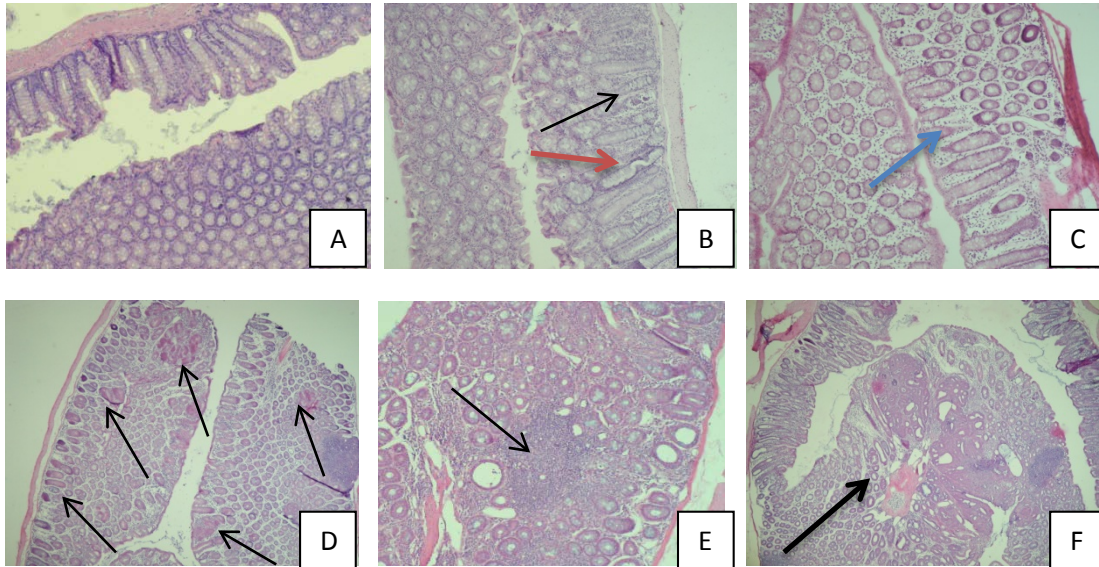


Figura 8. Microfotografía representativa de colon de ratón sano teñido con H y E 10X (A) y cambios histopatológicos en cortes de colon distal de ratones BALB/C tratados con DMH a 20mg/kg de peso corporal: B) En la semana 7 se observa inflamación leve, discreta depleción mucosecretora (→), absceso criptico (↗) 10X; C) En la semana 12 observamos inflamación crónica agudizada, edema notable depleción mucosecretora (↗) 10X; D) En la semana 24 aparecen criptas aberrantes (↘), franca depleción mucosecretora 4X; E) Semana 30, presenta carcinoma *in situ* (↘) datos de displasia y numerosos agregados linfoides 10X; F) En la semana 41 se observa un adenocarcinoma bien diferenciado de la mucosa del colon que corresponde a una lesión típica de cáncer de colon (↗) 4X.

Evaluación de cambios histológicos en colon distal de ratones expuestos a endosulfán

Con finalidad de evaluar el efecto de endosulfan en el desarrollo de cáncer inducido con DMH, en un grupo de ratones administramos el plaguicida a la par con este cancerígeno. El otro grupo de ratones fue expuesto solo a endosulfan. A continuación describimos los cambios que observamos desde primera hasta 41 semanas de experimentación.

Semana 1

En la figura 9 se observan los cambios arquitectónicos en criptas como núcleos hiper cromados y disminución de luz en todos los grupos experimentales, que caracteriza una inflamación leve. No se encontró diferencias entre grupos END y

END+DMH, ni entre géneros. Los tejidos de colon de ratones control presentaron una mucosa con arquitecturas típica, presencia de criptas y tejido colectivo normal (fig. 9).

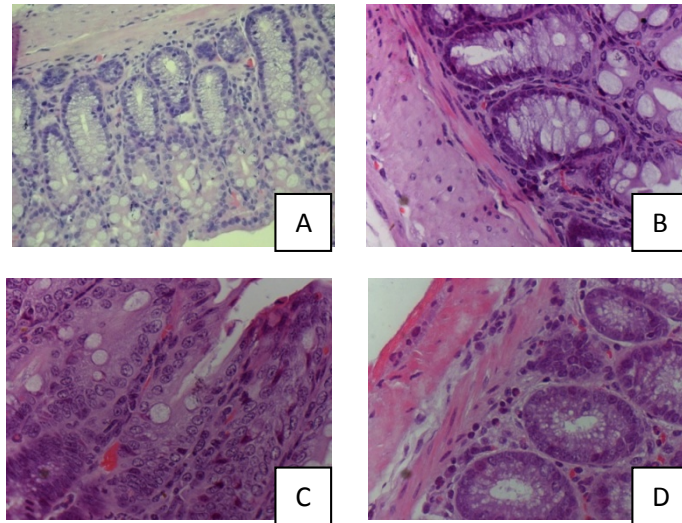


Figura 9. Microfotografías 40X de colon distal de ratones, tinción H y E: A) ratón sano y en grupos experimentales de primera semana de tratamiento, se observa inflamación leve B) Hembra END+DMH; C) Macho END; D) Hembra END.

No se observó el cambio en el comportamiento de ratones en todos los grupos en la primera semana de tratamiento con xenobioticos. Macroscopicamente se notó un leve edema de colon en grupo de endosulfan y DMH.

Semana 5

En los cortes colon hiperedematoso se observó infiltración linfocitaria con células plasmáticas, pérdida de mucosidad y alteración de núcleos. No se observó diferencia entre END y END+DMH, ni entre géneros (fig. 10).

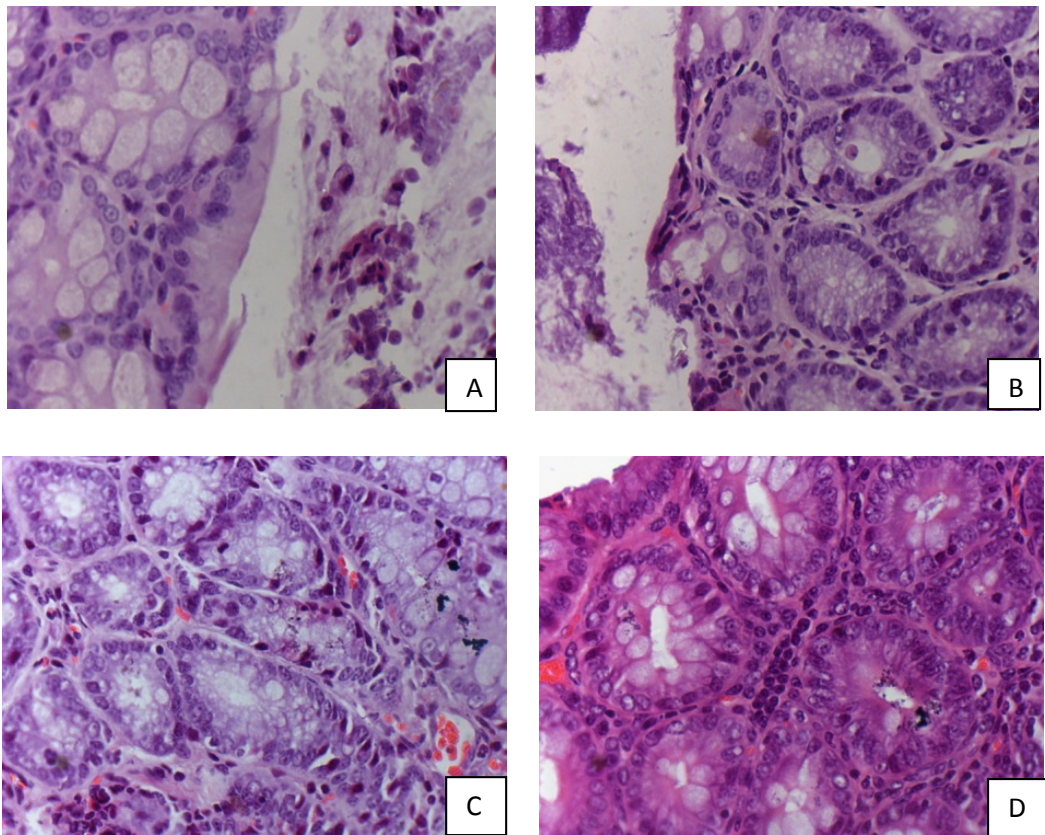


Figura 10. Microfotografías 40X de colon distal de ratones, tinción H y E, quinta semana de tratamiento: A) Hembra END+DMH; B) Macho END+DMH; C) Hembra endosulfán; D) Macho grupo END.

Tampoco se observó algún cambio en el comportamiento de ratones en todos los grupos en la quinta semana de tratamiento con xenobioticos. Macroscopicamente se notó un edema moderado de colon en grupo de endosulfan.

Semana 7

En los cortes se observó un aumento del espacio intersticial entre las criptas en todos los grupos experimentales, que caracteriza el incremento del edema tisular. En caso del corte de colon de hembra tratada con endosulfan se nota infiltración linfocitaria (➡) más que en los otros grupos (fig.11).

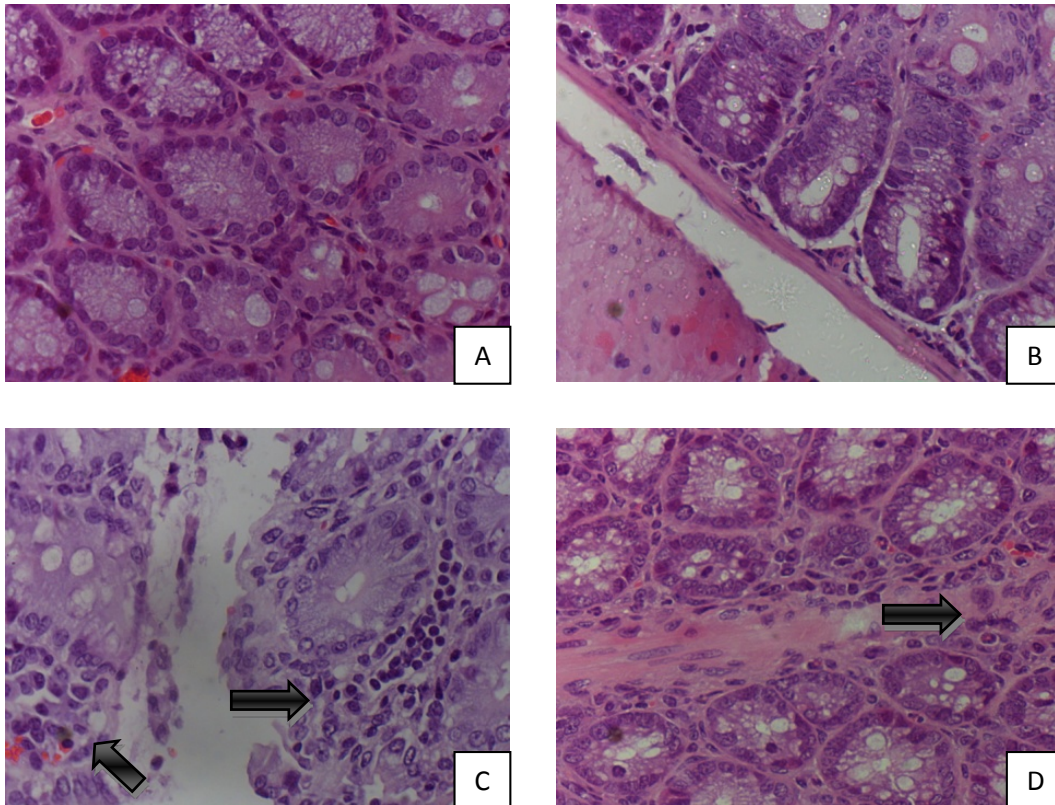


Figura 11. Microfotografías 40X de colon distal de ratones, tinción H y E, séptima semana de tratamiento: A) Hembra END+DMH; B) Macho END+DMH; C) Hembra END; D) Macho del grupo END.

En ratones del grupo END en ambos sexos se observó en la semana 7 de exposición al plaguicida la presencia periódica de heces no solidas con un poco de moco. En necropsia fue notable el aumento de diámetro de colon por edematoso e hipervascularizado en los mismos ratones.

Semana 12

Se observa infiltración linfocitaria exacerbada (↔) y aparición de criptas aberrantes (↙) en todos los grupos experimentales, pero con mayor notificación en grupos de END+DMH comparado con grupos de END (fig.12).

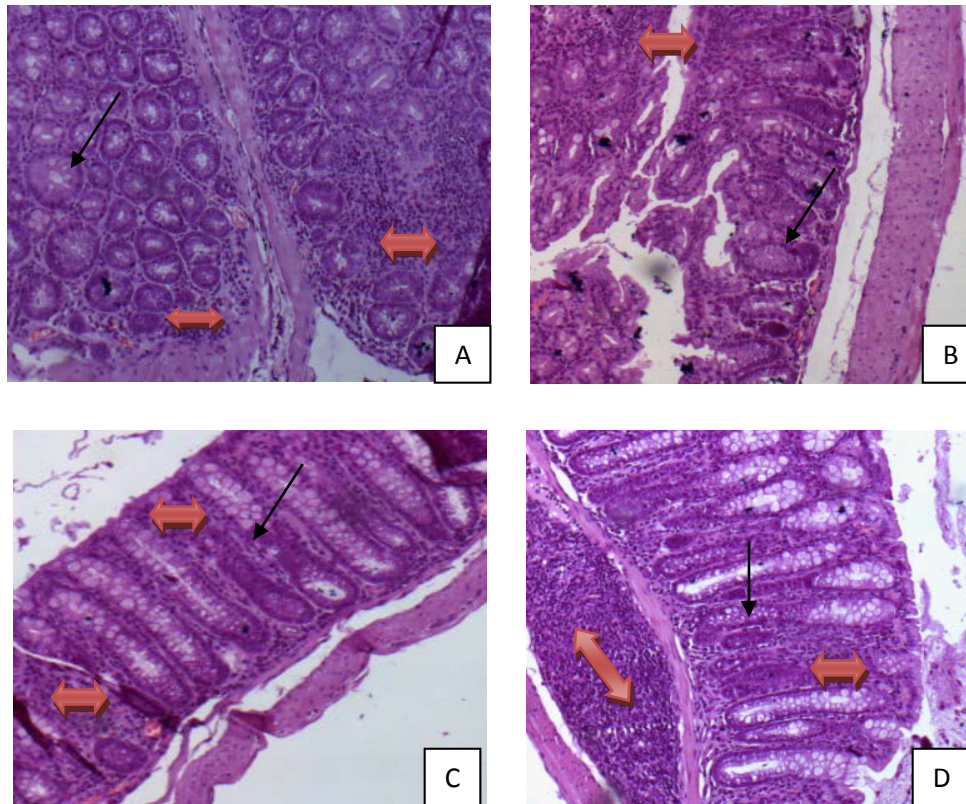


Figura 12. Microfotografías 10X de colon distal de ratones, tinción H y E, semana 12 de tratamiento: A) Hembra END+DMH; B) Macho END+DMH; C) Hembra END; D) Macho END.

En la semana 12 los ratones del grupo END + DMH de ambos sexos presentaron en mayor grado que los ratones del grupo END diarreas con moco. En necropsia fue bastante notable el aumento de diámetro de colon por edematoso e hipervascularizado en los mismos ratones.

En cortes con aumento 40X de colon distal de ratones hembras en la semana 12 se muestra más notable la infiltración por células plasmáticas que en grupos de los machos, mayor infiltración linfocitaria (↔) en grupo de hembra END+DMH que en hembra con solo endosulfan (fig. 13).

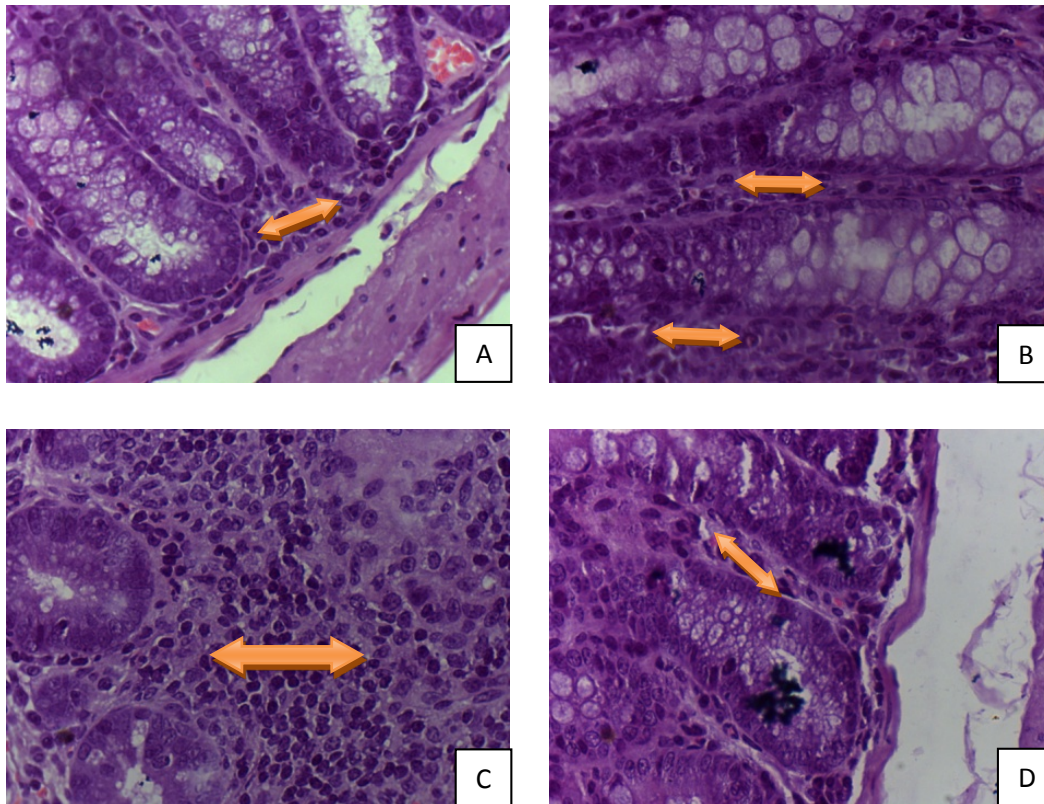


Figura 13. Microfotografías 40X de colon distal de ratones, tinción H y E, semana 12 de tratamiento 40X: A) Hembra END+DMH; B) Macho END+DMH; C) Hembra END; D) Macho END.

Semana 24

En cortes histológicos de todos los grupos experimentales se observa infiltración linfocitaria exacerbada (↔), pérdida de arquitectura y múltiples focos de criptas aberrantes (↘). En corte de colon de ratón hembra tratada sólo con endosulfan se observan numerosos eritrocitos en espacio extravasal. Mientras que en corte de colon de ratón hembra del grupo END+DMH se nota mayor pérdida de arquitectura que en los demás grupos (fig. 14, D).

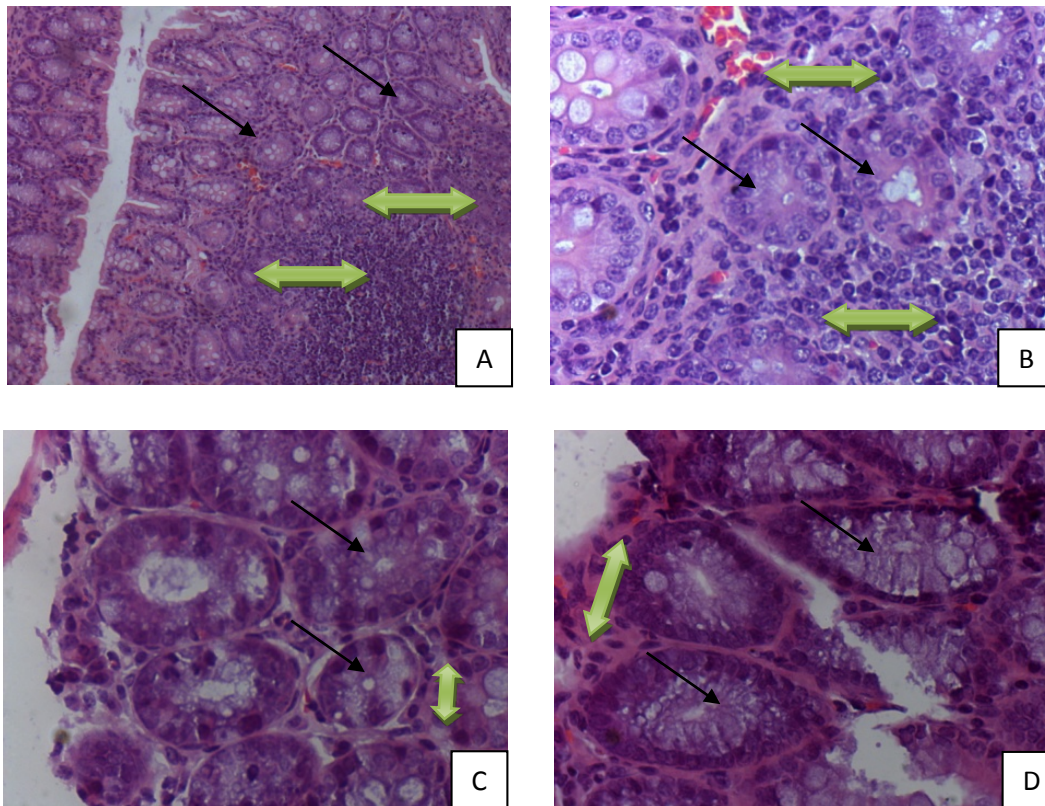


Figura 14. Microfotografías de colon distal de ratones, tinción H y E, semana 24 de tratamiento: A) Hembra END 10X; B) Hembra END 40X; C) Macho END 40X; D) Hembra END+DMH 40X.

En la semana 24 de exposición a xenobióticos se observó la sangre en heces fecales de ratones de ambos sexos del grupo END+DMH y en hembras del grupo tratado solo con endosulfan. Debido a que por un accidente fue roto el frasco con muestra de colon de ratón macho del grupo END+DMH, no se pudo presentar el corte.

Semana 30

En el corte de colon distal de ratón hembra tratada solo con endosulfan se observa colitis ulcerativa crónica: notable infiltración linfocitaria (↔) de células plasmáticas, severa depleción mucosecretora, núcleos hiper Cromáticos (↘), agrandamiento nuclear; desprendimiento del epitelio leve (↔) y notable congestión vascular (fig. 15).

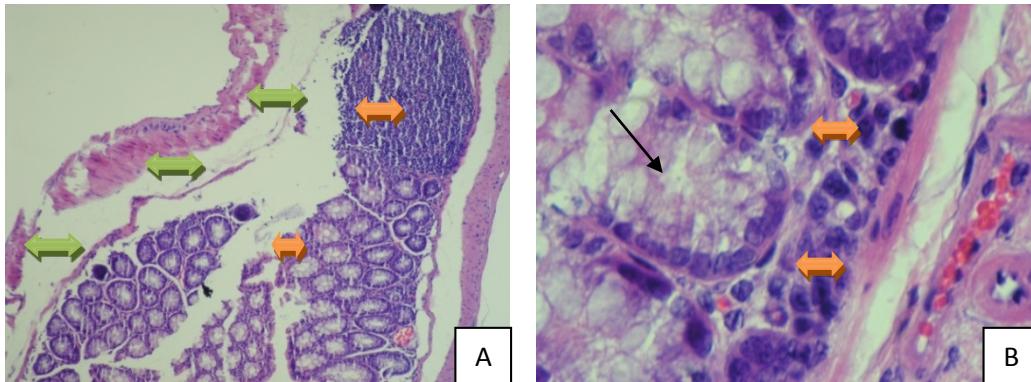


Figura 15. Microfotografías de colon distal de ratón hembra del grupo EDN, semana 30 post exposición, tinción H y E: A) Corte con aumento 10X; B) Corte con aumento 40X.

En colon de ratón macho del grupo EDN+DMH se observa notable hiperplasia linfoide (fig. 16, A) e infiltración de leucocitos polimorfonucleares en la mucosa y en tejido muscular (↔); desprendimiento de epitelio con numerosas criptas aberrantes (↘), inflamación crónica y aguda (fig.16, B).

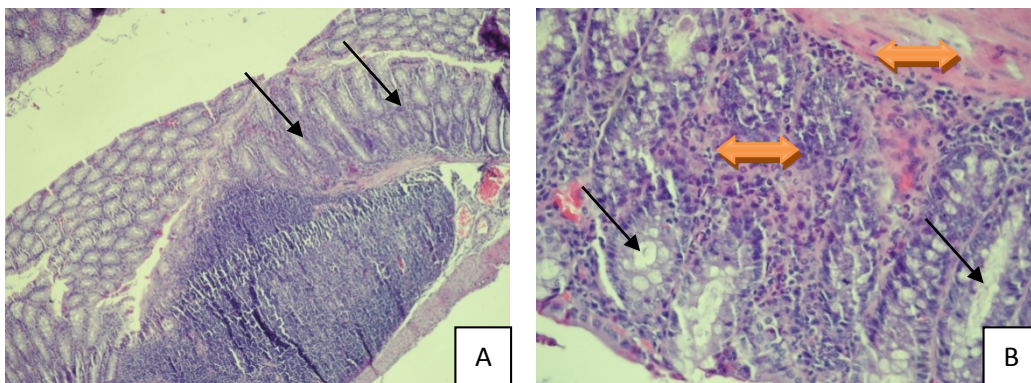


Figura 16. Microfotografías de colon distal de ratón macho del grupo EDN+DMH, semana 30 post exposición, tinción H y E: A) Corte con aumento 10X; B) Corte con aumento 40X.

En la semana 30 post exposición a los xenobioticos los ratones de ambos grupos experimentales muestran dificultad al momento de defecar, hay sangre en su excremento. Ratón hembra del grupo END además presenta hepatomegalia y exacerbada esplenomegalia (el bazo casi rodea los intestinos como un cinturón). Los intestinos son tan inflamados que al momento de abrir el abdomen salen como globos inflados. Este ratón no muestra interés ni al alimento ni a sus compañeras de jaula, mayor tiempo esta inmovilizado.

Ratones machos de los grupos experimentales de END y END+DMH fallecieron en semanas 30-35 antes de ser sacrificados, por lo que no hay datos sobre cambios histopatológicos de su colon.

Semana 35

En corte de colon de ratón hembra tratado con solo endosulfan se observa hiperplasia linfoide en acúmulos densos en la mucosa y submucosa, folículos linfoides (↘) con centros germinales muy activos (fig. 17, A), acompañada de infiltrado periférico a estos agregados de leucocitos polimorfos nucleares que llegan a infiltrar la capa muscular (↔) (fig. 17, B). Además de una exagerada inflamación crónica y aguda por presencia de muchos polimorfonucleares y células plasmáticas (fig. 19, C).

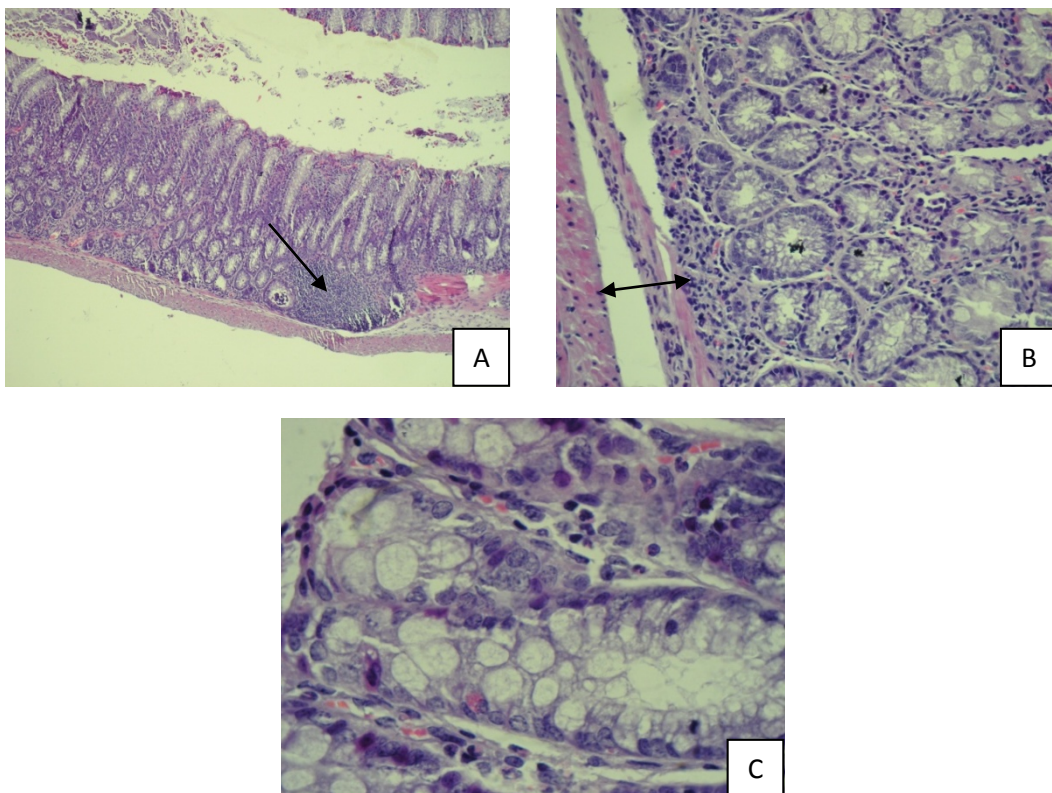


Figura 17. Microfotografías de colon distal de ratón hembra del grupo END, semana 35 post exposición, tinción H y E: A) Corte con aumento 10X; B) Corte con aumento 40X; C) Corte con aumento 100X.

Semana 41

En cortes histológicos de ratón hembra del grupo END+ DMH en la figura 18, A se observa exacerbada hiperplasia linfoide (\blacktriangledown) con múltiples agregados densos de linfocitos en la submucosa y parte de la mucosa, poliposis (\leftrightarrow). La figura 18, B demuestra una completa transformación del tejido colónico, metaplasia severa sin llegar a neoplasia, así como moderada atipia regenerativa en el epitelio columnar del fondo de las criptas (agrandamiento nuclear y hiper cromasia sin pérdida de la polaridad) y unos leucocitos polimorfos nucleares en el borde del infiltrado.

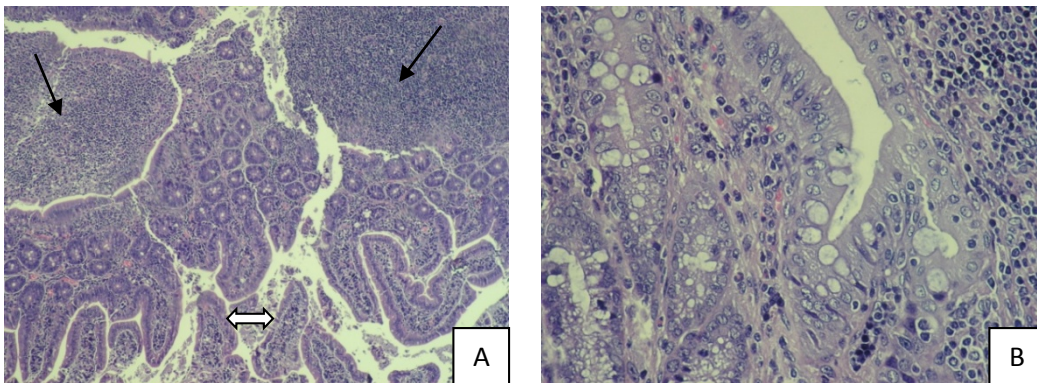


Figura 18. Microfotografías de colon distal de ratón hembra del grupo END+ DMH, semana 41 post exposición, tinción H y E: A) Corte con aumento 10X; B) Corte con aumento 40X.

En cortes histológicos de ratón hembra del grupo END con 41 semanas post exposición en la figura 19, A se observan múltiples focos preneoplásicos y displásicos, exacerbada congestión vascular (\leftrightarrow); cambios regenerativos con mitosis y trastornos de arquitectura de criptas concriterios de displasia como glándulas “espalda con espalda” ($\langle \rangle$) en la figura 19, B.

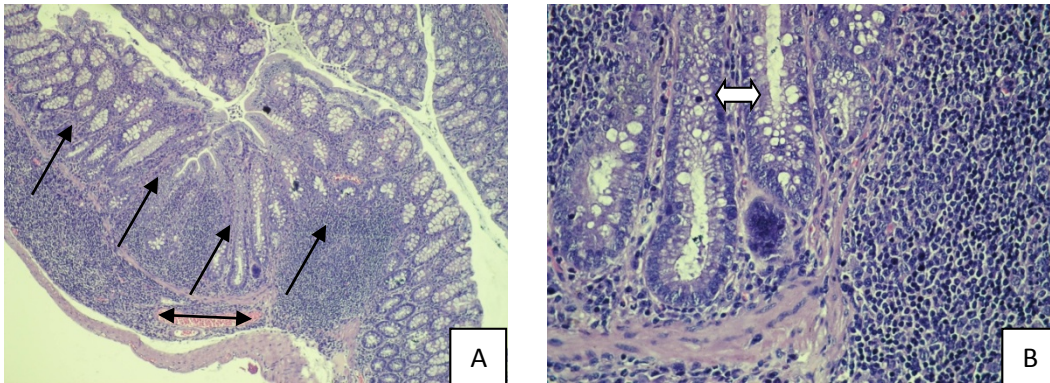


Figura 19. Microfotografías de colon distal de ratón hembra del grupo END, semana 41 post exposición, tinción H y E: A) Corte con aumento 10X; B) Corte con aumento 40X.

Datos adicionales

Aunque nuestro objetivo fue realizar solo cortes de colon distal y no contemplamos procesar los demás órganos, hicimos cortes histológicos del bazo e hígado de ratones hembra del grupo END en las semanas 30 y 52 post exposición debido a un cambio notable macroscópico en ellos al momento de extracción de colon. Encontramos en 30 semanas el bazo (figura 20, B y C) e hígado (figura 21, B y C) con la infiltración linfoproliferativa neoplásica difusa que corresponde a leucemia, aunque para confirmar este diagnóstico sería conveniente complementar el estudio de estos cortes con el análisis inmunohistoquímico con marcadores de leucemia y con los datos de medula ósea. En apartado A de las figuras 20 y 21 se observan cortes de bazo e hígado respectivamente de ratón sano.

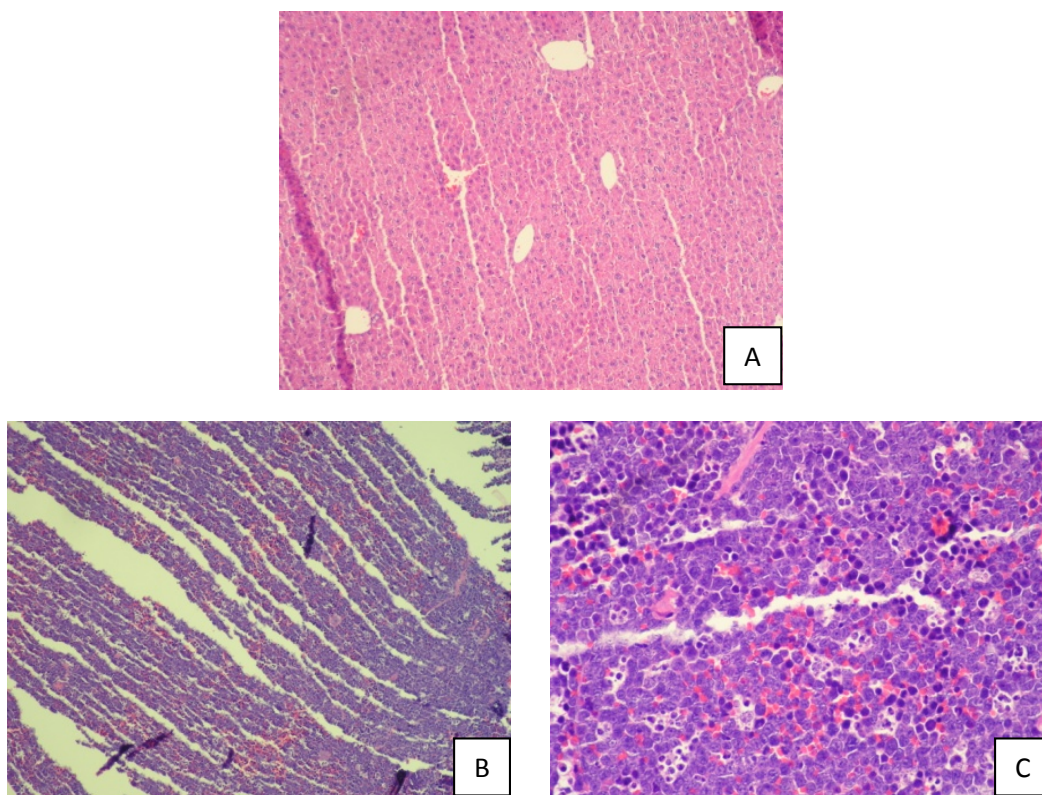


Figura 20. Microfotografías de bazo de ratón, tinción E y H. A) Macho control 10X; B) Hembra END semana 30 post exposición 10X; C) Hembra END semana 30 post exposición 40X.

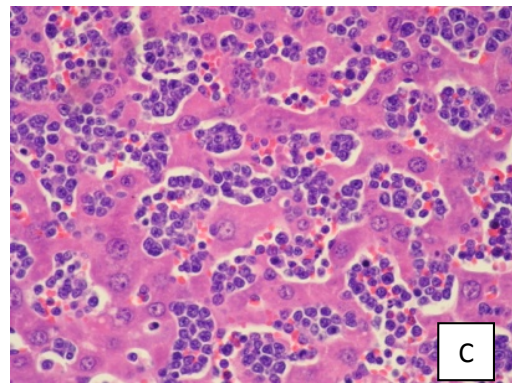
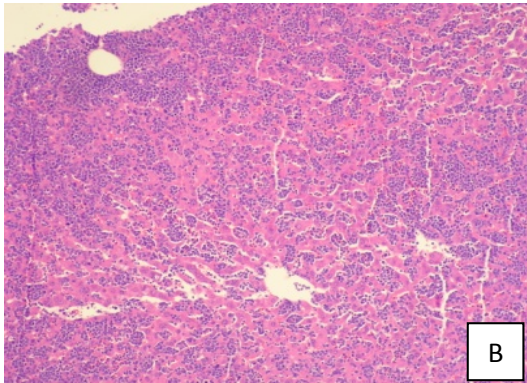
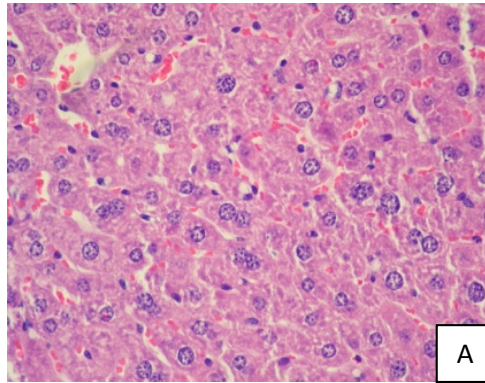


Figura 21. Microfotografías de hígado de ratón, tinción E y H. A) Macho control 40X; B) Hembra END semana 30 post exposición 10X; D) Hembra END semana 30 post exposición 40X.

En la figura 22 se observa una infiltración neoplásica linfoproliferativa sólida con células grandes inmaduras, mitosis atípica que corresponde a linfoma no Hodgkin.

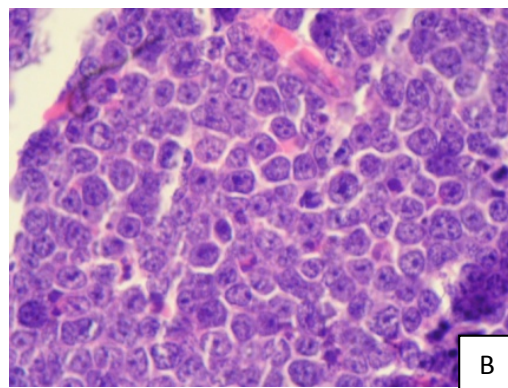
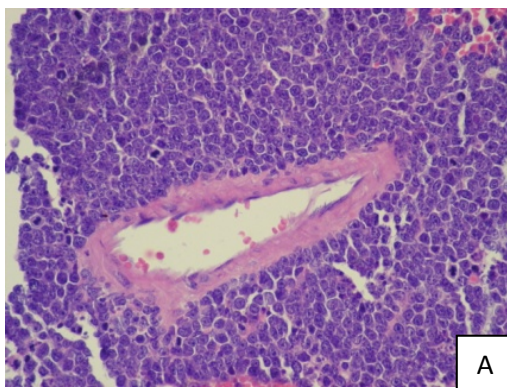


Figura 22. Microfotografías de hígado de ratón hembra END semana 52 post exposición con linfoma no Hodgkin: A) aumento 10X y B) aumento 40X.

Determinación de los niveles séricos de IL-6, IL-10 Y TNF- α en grupos ratones BALB/C expuestos a endosulfán y DMH

Con la finalidad de estudiar los parámetros inmunológicos que están relacionados con el desarrollo de cáncer se midieron las concentraciones de interleucinas IL-6, IL-10 y TNF α en sueros de los ratones en estudio.

En la figura 23 se observan niveles bajos de IL-6 en grupo control, notable incremento de IL-6 en las semanas 5, 24 y 52 del grupo END, un aumento de esta interleucina proinflamatoria en semanas 30 y 41 del grupo END+DMH.

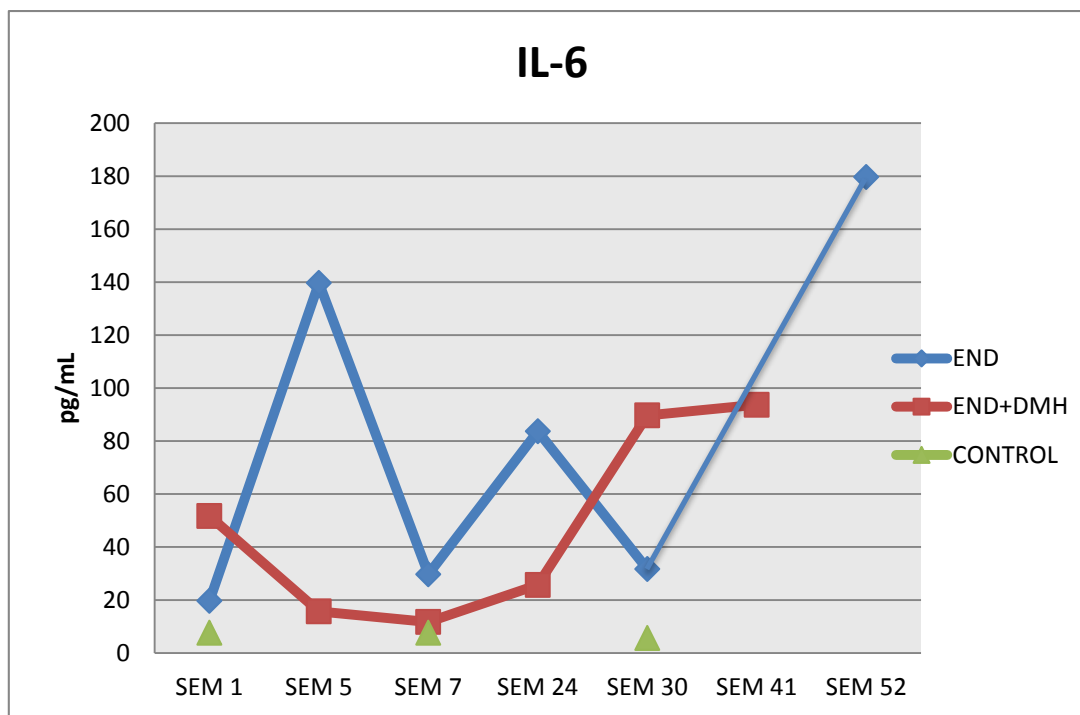


Figura 23. Niveles séricos de IL-6 en semanas 1, 5, 7, 24, 30, 41, y 52 de post exposición en ratones de grupos END y END+DMH.

En la figura 24 se observa niveles bajos de IL-10 en grupo control, notable incremento de IL-10 en las semanas 30, 41 y 52 del grupo END, un aumento de esta interleucina proinflamatoria en semanas 1 y 30 del grupo END+DMH.

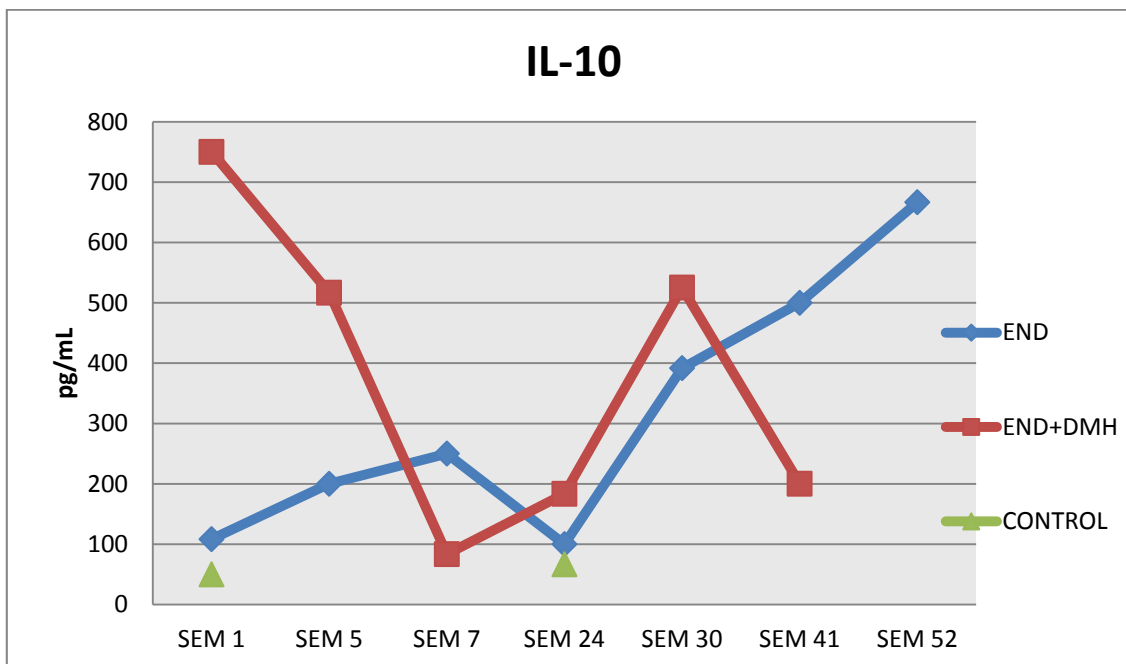


Figura 24. Niveles séricos de IL-10 en semanas 1, 5, 7, 24, 30,41, y 52 de post exposición en ratones de grupos END y END+DMH.

En la figura 25 se observa la dinámica del aumento de TNF- α en ambos grupos END y END+DMH en semanas 30, 41 y 52, más notable en grupo END.

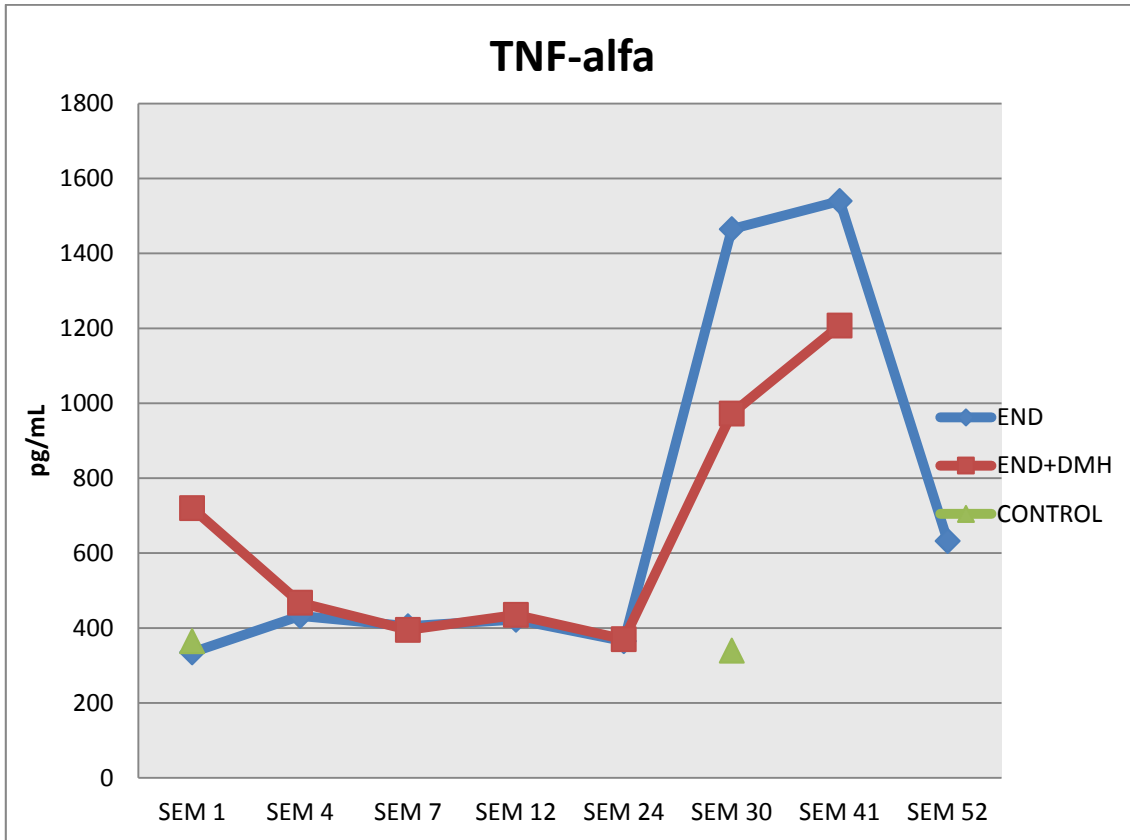


Figura 25. Niveles séricos de TNF-alfa en semanas 1, 4, 7, 12, 24, 30, 41, y 52 de post exposición en ratones de grupos END y END+DMH

Debido a grupos experimentales reducidos y a que no en todos los ratones sacrificados pudimos obtener suficiente cantidad de suero para determinar las tres interleucinas contempladas, fue imposible realizar el análisis estadístico, por lo que consideramos este trabajo como un estudio piloto con valor predictivo en la dinámica de producción de interleucinas en exposición crónica a endosulfan *in vivo*.

DISCUSIÓN

En estudios previos del laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular del CUCBA se demostró el efecto inmunotóxico de endosulfán en tilapia (Téllez-Bañuelos *et al.* 2009-2011). Con finalidad de poder transpolar estos datos a humano, se decidió realizar un estudio del efecto de este plaguicida en mamíferos usando un modelo murino de cáncer de colon ya establecido en el Departamento.

La exposición al cancerígeno DMH y a endosulfán fue realizada simultáneamente durante 24 semanas, aunque la observación de los ratones y sacrificio periódico continuó hasta 41 semanas, con la excepción de un ratón del grupo END, el cual fue observado y sacrificado hasta 52 semanas.

Como primer objetivo fue la inducción de cáncer de colon con DMH, lo que se confirmó con los estudios histopatológicos que permitieron describir las lesiones tisulares. En ratones expuestos solo a DMH se observó la aparición de elementos precancerígenos como criptas aberrantes en 24 semanas, adenocarcinoma *in situ* a la semana 30 y cáncer de colon a la semana 41 (figura 8 D, E y F), lo que coincide con los estudios de Cazares, 2010 e Irecta, 2013.

En el segundo objetivo describimos cambios histopatológicos en cortes de colon distal del grupo tratado solo con endosulfan (END) y el grupo tratado con plaguicida y el cancerígeno a la par (END+DMH). En la semana 1 y 5 se notó la aparición de signos de inflamación aguda de leve a moderada, aunque no se encontró diferencias entre grupos END y END+DMH, ni entre los géneros (figura 9 y 10). En la semana 12 se observó la inflamación crónica de moderada a severa y aparición de algunas criptas aberrantes en todos los grupos experimentales, pero con mayor intensidad en grupos de END+DMH comparado con grupos de END, así como con mayor daño en hembras que en machos (figura 12). En la semana 24 en cortes histológicos de todos los grupos experimentales se observaron

múltiples focos de criptas aberrantes como lesiones preneoplásicas, más notables en corte de colon de ratón hembra del grupo END+DMH (figura 14). En la semana 30 en el corte de colon distal de ratón hembra tratada solo con endosulfan se observó colitis ulcerativa crónica severa, cuando el corte de colon de ratón macho del grupo EDN+DMH mostró signos de inflamación crónica y aguda así como numerosas criptas aberrantes pero sin hallazgo de adenocarcinoma, al igual que en la semana 41 donde se observó completa transformación del tejido colónico con pseudopoliposis y una metaplasia severa que no llegó a neoplasia en hembra tratada con END+ DMH. En hembra tratada solo con endosulfan a la semana 41 tampoco se observaron signos de cáncer, aunque se notan múltiples focos pleneoplásicos y displásicos (figura 19).

El hecho de que la exposición crónica a endosulfan afectó más a los ratones hembras que a los machos se debe a la propiedad xenoestrogénica de este plaguicida. Los compuestos estrógeno activos como lo son las plaguicidas órgano clorados son disruptores endocrinológicos y tienen efecto nocivo sobre el sistema inmune (Narita *et al.* 2007). Las células inmunocompetentes poseen receptores para estrógenos, los estudios *in vitro* demuestran mayor densidad de receptores estrogénicos en células de hembras en comparación con los de machos y capacidad de órgano clorados unirse a estos receptores (Lemaire G. *et al.* 2006). Estos datos están acorde con nuestro previo estudio donde se determinó la DL₅₀ de endosulfan, la que fue casi cuatro veces menor para las hembras que para los machos de ratones BALB/C (Mendoza *et al.* 2010).

Según nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero que investigó el efecto de endosulfan en un modelo murino de cáncer de colon experimental. Nuestro hallazgo aporta que este plaguicida provoca la inflamación severa de colon y acelera la aparición de elementos preneoplásicos (criptas aberrantes) en ratones tratados con DMH y endosulfan a las 12 semanas comparado con 24 semanas del grupo con solo DMH (figura 8 y 12), así como elementos probablemente de leucemia linfoblástica a las 30 semanas y de linfoma no Hodgkin a las 52 semanas en ratones tratados con endosulfan, este hallazgo es

congruente con el reporte de Ross *et al.* (2003) sobre el desarrollo de linfomas en la población expuesta a pesticidas y datos de Bedor *et al.* (2010) sobre el potencial cancerígeno de endosulfan. Aunque Howsam *et al.* (2004) relacionan la exposición a los plaguicidas órgano clorados, como lo es endosulfan, con el riesgo de cáncer de colon y observamos pseudopoliposis y metaplasia severa en colón de ratones del grupo END+DMH a semana 41, no se encontró el cáncer en cortes colónicos de ratones expuestos a solo endosulfan hasta el término de nuestra experimentación (figura 18 y 19).

Sugerimos que la exposición a endosulfan permitió contrarrestar el efecto cancerígeno de DMH en lugar de facilitar el desarrollo de cáncer de colon en este modelo debido a su efecto antiapoptótico en células epiteliales (Antherieu S. *et al.* 2007), por su efecto xenoestrogénico y activación inespecífica de linfocitos Tc (Wang *et al.* 2008), además de su efecto proinflamatorio que observamos al realizar el tercer objetivo, esto es, la determinación de IL-6, TNF- α e IL-10 en sueros de los ratones en experimentación. Encontramos en la semana 5 y 24 un incremento de niveles séricos de IL-6 en suero de ratones BALB/C en grupo END relacionado con el inicio de inflamación e infiltración linfocitaria notable en cortes de colón, así como en la semana 30 en grupo de DMH+END relacionado con numerosos elementos precancerígenos (figura 15). Lo que coincide con los estudios *in vitro* de Han *et al.* (2007) y Reyes-García *et al.* (2009) sobre el incremento de síntesis de IL-6 y el efecto proinflamatorio de endosulfan debido a su mecanismo de acción por inhibir al receptor de GABA; Mendu *et al.* (2012) confirmó la presencia del sistema GABAérgico en linfocitos de mamíferos. Se sabe que pacientes con CCR tienen niveles elevados de IL-6 en suero y que estas concentraciones se correlacionan con un incremento de esta citocina en los tejidos tumorales. La IL-6 juega un papel importante en la supervivencia de las células transformadas, ya que promueve la angiogénesis induciendo la expresión de VEGF.

En el comportamiento de los niveles de IL-10 en ratones del grupo END se observa casi “efecto espejo” en relación con los niveles de IL-6 (figura 23 y 24),

probablemente debido al efecto marginado de IL-10 para la producción de IL-6. En los ratones del grupo DMH+END se observó en figura 26 el aumento de IL-10 sérica en semanas 30 y 41, lo que puede estar relacionado con aparición la células B neoplásicas de linfoma, las cuales según Gastl *et al.* (1993) producen grandes cantidades de IL-10 para disminuir la respuesta inmune antitumoral.

Encontramos niveles elevados de TNF- α en suero de ratones BALB/C en ambos grupos END y END+DMH a partir de la semana 30 (figura 25). Existen numerosos reportes que respaldan un incremento de citocinas pro-inflamatorias en el cáncer, Han *et al.* (2007) proponen a la inflamación crónica como un marcador y condición que predispone a la formación de cáncer. También se ha reportado incremento en la producción de TNF α en cáncer de colon (CC), donde la mayor fuente celular de esta citocina son los macrófagos y neutrófilos. El modelo de inducción de CC con DMH conlleva a un infiltrado inflamatorio severo y con ello encontramos un aumento en los niveles de TNF α en suero en el grupo de DMH+END ya en etapa de aparición de elementos numerosos metaplásicos. La inflamación daña al tejido colónico estimulando la reparación del mismo a través de replicación epitelial elevada, lo que incrementa la tasa de mutaciones que pueden trascender a condiciones de cáncer. Un ejemplo de ello es la predisposición que los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal crónica y enfermedad de Crohn tienen para desarrollar CC.

El efecto proinflamatorio de endosulfan también se evidencia por incrementar las moléculas involucradas en este proceso, en un trabajo reciente reportamos la sobreexpresión de P-selectina en colón distal de ratones desde primer mes de exposición a 2mg/kg de este plaguicida en hembras y desde segundo mes en machos; la expresión de β -catenina se aumentó en estos ratones desde aparición de numerosas criptas aberrantes en seis meses de exposición (Zaitseva *et al.*2014). Aunque en nuestro modelo de cáncer de colón inducido con DMH y con la exposición crónica a dosis subletal de endosulfán no observamos durante 41 semana cáncer de colon como tal, pero si encontramos numerosos elementos

precancerígenos en los ratones expuestos a este plaguicida, lo que puede probablemente llevar al cáncer con más tiempo de observación. Esta suposición se confirma con nuestro hallazgo de elementos linfoproliferativos neoplásicos como linfoma no Hodgkin en un ratón de 52 semanas de post exposición a endosulfan. Este plaguicida altera severamente la salud de mamíferos, por lo tanto deben prohibir su uso en México, como ya lo han hecho en Comunidad Europea y en Argentina

CONCLUSIONES

La exposición crónica por 24 semanas de ratones BALB/C a dosis subletal (2mg/kg) de plaguicida órgano clorado endosulfan induce:

- la inflamación severa de colón y aceleración de aparición de elementos preneoplásicos como criptas aberrante (en ratones tratados con endosulfán a las 12 semanas en comparación con 24 semanas del grupo con solo DMH);
- pseudopoliposis y metaplasia severa en colón de ratones del grupo DMH+END a semana 41;
- mayores alteraciones en colón distal de hembras que en machos, llevando al desarrollo de colitis ulcerativa y probablemente a la leucemia en 30 semanas de post exposición;
- un notable incremento de niveles séricos de interleucinas pro inflamatorias como IL-6 en 5 semanas y TNF- α en 30 y 41 semanas, así como un aumento de IL-10 en 30 y 41 semanas de post exposición en ambos sexos;
- probablemente linfoma no Hodgkin en ratón con 52 semanas de post exposición.

BIBLIOGRAFÍA

Abadin H., Chou C., Lladós T. (2007). "Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels: Immunological effects", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*; 47(3):249-256.

Abbas A K. (2008). "Inmunología Celular y Molecular". 6ta Edición. Barcelona España.

Antherieu, S., N. Ledirac., A.P. Luzy., P. Lenormamand., J.C. Caron., Rahmani R. (2007). "Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism." *J Cell Physiol*; 213(1): 177-86.

Ayub M. and Thale A. (2003). "The cavernous body of the human efferent tear ducts contributes to regulation of tear outflow". In *Ophthalmol Vis Sci* 44(11): 4900-7.

Bartual José y Berenguer María, (1998). "Pesticidas: Clasificación y riesgos principales" NTP 143. Ministerio de trabajo y asuntos sociales España.

Bedor C. N., R. J Morais., L.S.Cavalcanti., J.V. Ferreira., Pavão A.C. (2014). "Carcinogenic potential of endosulfan and its metabolites based on a quantum chemical model". *Sci Total Environ.* 408(24):6281-4.

Caro Paton, G. A. (2005). "Interleucinas y cáncer de colon." *Esp. enferm. Dig*; 9(97): 613-618.

Carson E. (2011). "Seeking the Causes Of Sepsis: Life-Threatening Bacterial Infection Remains Myterious" *Inside Life Science.*

Cáceres J., Flores F., Hernández J., López R., Machuca C., Mayani H., Mendoza J., Monroy A., Montesinos J., Mora M., Rangel R., Ruiz G., Santiago E., Soto I.,

Weiss B., Zambrano I. (1999) "Las citocinas en la Hematopoyesis y el sistema inmunológico: mecanismos celulares y moleculares". Plaza y Valdés editores. p. 203-215.

Casida, J.E. and Quistad G.B. (2004). "Why insecticides are more toxic to insects than people: The unique toxicology of insects." J. Pestic. Sci. 29:81-86.

Cazares Alvares A. (2010). "Estandarización de un modelo experimental del cáncer de colon en ratones BALB/C inducido con 1,2-dimetilhidrazina". Tesis de Licenciatura en Biología, CUCBA Universidad de Guadalajara.

Cheng L. y Lai M. D. (2003). "Aberrant crypt foci as microscopic precursor of colorectal cancer". World J Gastroenterol, 9 (12): 2642-2649.

de la Cruz-Merino L., Grande-Pulido E., Albero-Tamarit A., Codes-Manuel de Villena M.E. (2008). "Cancer and immune response: old and new evidence for future challenges." Oncologist; 13(12):1246-54.

Fernández, A., M. Yarto. (2004). "Las sustancias tóxicas persistentes en México". Instituto Nacional de Ecología. México.

Gartner L.P. and Hiatt J.L. (2006). Color Textbook of Histology, 3rd edition.

Gastl G.A. , Abrams J.S. , Nanus D.M. , Oosterkamp R. , Silver J. , F. Liu , Chen M. , Albino A.P. , Bander N.H. (1993). "Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression." Department of Surgery/Urology, New York Hospital-Cornell Medical Center, NY 10021.

Granados G. A. y Herrera G. A. (2010). "Manual de Oncología". 4ta Edición. México. Editorial Interamericana-McGraw-Hill; 21-25.

Girndt M. (2003). "Humoral immune responses in uremia and the role of IL-10". Blood Purif. 20 (5): 485-8.

Han E., Hwang Y., Kim G., Jeong H. (2007). "Inflammatory effect of endosulfan via NF-kappaB activation in macrophages". *BiochemBiophys Res Commun*; 355(4): 860-5.

Howsam, M., J.O.Grimalt., E. Guinó., M. Navarro., J. Martí-Ragué. M. Peinado., G. Capellá., Moreno V. (2004). "Organochlorine Exposure and Colorectal Cancer Risk". *Environmental Health Perspectives* 112(15):1460-66.

INEGI (2004). "Boletín de información oportuna del sector alimentario". Fuente Registros Administrativos Desglose geográfico Nacional información de Estados Unidos Mexicanos; 241:76.

INEGI (2013). "Egresos Hospitalarios". Base de datos. Fuente: SSA.

Irecta Najera C. A. (2013). "Estudio del efecto protector e inmunomodulador de *Lactobacillus casei* en un modelo murino de cáncer colorrectal y su asociación con los niveles de poliaminas en orina". Tesis de Doctorado, CUCS-CUCBA, Universidad de Guadalajara.

Kalender, S., Y. Kalender., A. Ogutcu., M. Uzunhisarcikli., D. Durak, Açikgoz F. (2004). "Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E." *Toxicology*; 202(3): 227-35.

Ledirac, N., S. Antherieu, A.D.d'Uby., J.C.Caron., Rahmani R. (2005). "Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species." *Toxicol Sci*; 86(2): 444-52.

Lemaire, G., W. Mnif., P.Mauvais., P. Balaguer., R. Rahmani. (2006). "Activation of alpha- and beta estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines." *Life Sci*; 79(12): 1160- 9.

León, V. M. y Sáenz R.F. (2007). "Focos de criptas aberrantes". *Gastr Latinoam*; 18 (4): 383-389.

Ligong, C., Kathleen D., John C. (2006). "Structural model for γ -aminobutyric acid receptor noncompetitive antagonist binding: Widely diverse structures fit the same site". PNAS. March 28(13): 103-113.

Litman, G. W., J. P. Cannon, et al. (2005). "Reconstructing immune phylogeny: new perspectives." NatRevImmuno 5(11): 866-879.

Mendez J. Huerta L., Bellanti J., Ovilla M., Escobar G. (2008). "Alergia Enfermedad multisistémica, Fundamentos básicos y clínicos" Editorial Medica Panamericana. p.41

Mendoza M., Zaitzeva G., Arellano L. (2010). "Estudio del efecto de endosulfán en el desarrollo de la respuesta inmune en los ratones con cáncer de colon". 1er Congreso Internacional de Salud Ambiental, Guadalajara, Jalisco, México.

Nagasawa H T.,Shirota F N., Matsumoto H. (1972). "Decomposition of methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin in D20". Nature, 236: 234-235.

Narita, S.I., Goldblum, R.M., Watson, C.S., Brooks, E.G., Estes, D.M., Curran, and E.M. y Midoro-Horiuti, T. (2007). " Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergic mediators". Environmental Health Perspectives, 115(1): 48-52.

Newberne P.M. and Rogers A.E. (1973). "Animal model: DMH induced adenocarcinoma of the colon in the rat". American journal of Pathology; 72: 541-544.

Ocaña Pérez Esther y Gassó Campos Manuela. (2011). "Cancer colorrectal. Mutaciones en KRAS y EGFR" Ed Cont Lab Clin; 14: 32-44

Piñolis F. C. (1999). "Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-Dimetilhidrazina. Universidad Lleida: Salamanca. p. 315-21.

Prophet E., Mills B., Arrington J., Sobin L. **(1995).** "Métodos Histotecnológicos". Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Washington, D.C.

Reyes-García, M.G., Hernández-Hernández, F., Hernández-Téllez, B. y García-Tamayo, F. **(2009).** "GABA (A) receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulates their IL-6/IL-12 production". In Journal of Neuroimmunology, 188(1), 64-68.

Rivero O., Rizo P., Ponciano G., Oláiz G. **(2001).** "Daños a la salud por plaguicidas". Manual Modern, México, DF.

Roos, A., S. Zahm, K. Cantor., D. Weisenburger., F. Holmes., L. Burmeister., Blair A.. **(2003).**"Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men". Occup Environ Med; 60:e11.

Singh N y Sharma A. (2007). "Citrinin and endosulfan induced teratogenic effect in Wistar rats". J. appl Toxicol; 27(2):143-151.

Soliman, A., M. Smith.,S.P. Cooper., K. Ismail., H. Khaled., S. Ismail., R.S. McPherson., I.A.Seifeldin., Bondy M.L. (1997). "Serum Organochlorine Pesticide Levels in Patients with Colorectal Cancer in Egypt". Archives of Environmental Health: An International Journal, 52: 409 – 15.

Suñol, C., Z. Babot., E. Fonfría, M. Galofré., D. García., N. Herrera., S. Iraola., Vendrella I. **(2008).** "Studies with neuronal cells: From basic studies of mechanisms of neurotoxicity to the prediction of chemical toxicity". Toxicol In Vitro; 22(5): 1350-5.

Schoeters, G., E. Den Hond, W. Dhooge., N.VanLarebeke., Leijns M. **(2008).** "Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development." Basic Clin Pharmacol Toxicol; 102(2): 168-75.

Tanaka, T. (2009). "Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies." J Carcinog 8: 5.

Tellez-Bañuelos, M. C., A. Santerre., J. Casas-Solis., A. Bravo-Cuellar., Zaitseva G. (2009). "Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan." *Fish&Shellfish Immunology*. 27 (2): 105-11.

Tellez-Bañuelos, M. C., A. Santerre, J. Casas-Solis., Zaitseva G. (2010). "Endosulfan increases seric interleukin-2 like (IL-2L) factor and immunoglobulin M (IgM) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Aeromonahydrophila*". *Fish & Shellfish Immunology*; 28 (2): 401-5.

Télez-Bañuelos, M. C., Ortiz-Lazareno, P.C., Santerre, A., Casas-Solis, J., Bravo-Cuellar, A. and Zaitseva, G. (2011). "Effects of low concentration of endosulfan on proliferation, ERK1/2 pathway, apoptosis and senescence in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) splenocytes". In *Fish & Shellfish Immunology*; 31(6), 1291-1296.

Yunquan L., Kanehisa M., Tatsuya T., Toru T., Takeshi S. (2000). "Genotoxic Effects of α -Endosulfan and β -Endosulfan on Human HepG2 Cells". *Environmental Health Perspectives*; 108(6).

Waldner M., C. C. Schimanski and M. F. Neurath M.F. (2006). "Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells". *World J Gastroenterol*; 12(45): p. 7233-8.

Walter J. (2000). "Environmental Medicine, Part 4: Pesticides Biologically Persistent and Ubiquitous Toxins". *Alternative Medicine Review*. 5(5): 432-446.

Wang, F., E. S. Sobel, E.J. Butfilosk., Roberts S.M. (2008). "Comparison of chlordecone and estradiol effects on splenic T-cells in (NZBxNZW)F(1) mice". *Toxicol Lett*.183 (1-3):1-9.

Ware, G. W. and Whitacre D.M. (2004). "An Introduction to Insecticides". In: *The Pesticide Book*, 6th ed. Meister Pro Information Resources. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio. USA.

Weinberg J., Buchholz R. (2006). "TNF- alpha Inhibitors". Birkhauser.1-43.

Wong F., Alegria H., and Bidleman T. (2010). "Organochlorine Pesticides in Soils of Mexico and the Potential for soil-air Exchange". Environ Pollut; 158 (3).

Zdanov A., C. Schalk-Hihi, A. Gustchina, M. Tsang, J. Weatherbee and Wlodawer A. (1995). "Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon γ ." Structure, 15; 3:591-601.

Zaitseva GP, Rubio Chávez LA, Peregrina -Sandoval J , Tellez- Bañuelos MC. (2014). "The effect of chronic exposure to sublethal doses of endosulfan on the expression of IL-6, IL -10 and TNF- α and histopathological changes in a mouse model of colon cancer." En 53rd Midwinter Conference of Immunologists. Enero 25-28 de 2014, Asilomar, California, EUA.

Consulta en línea:

Ames R. (2012) "Interleukin-6: Catabolic Agent or Growth Factor". Revisión en Diciembre 2014. <http://www.mesomorphosis.com/articles/ames/interleukin-6.htm>

Bejarano, G.F. (2008). "El endosulfán como nuevo COP en el Convenio de Estocolmo, perspectivas México: 20 y 21 de mayo de 2008". *Tercer Foro de Investigación sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes* en: http://www.ine.gob.mx/Descargas/sqre/foro_cops_3_pon_Cbejarano.pdf

Bejarano, G.F., J. Souza, J. Weber.,C. Guadarrama., E. Escamilla., B. Beristáin., M. Acosta., M.Cárcamo., Ramírez F. (2008). "El endosulfán y sus alternativas en America Latina". Subdirección del Centro Regional Universitario Oriente de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) en http://www.rapaluruaguay.org/endosulfan/ Alternativas _endosulfan. pdf

Mendu SK, Bhandage A, Jin Z, Birnir B. (2012). "Different subtypes of GABA-a receptors are expressed in human, mouse and rat T lymphocytes". *PLoS One*; 7: e42959. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042959>

Organizacion Mundial de la Salud – OMS (2010)."Cáncer". Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. Fecha de consulta: 14-08-2014.

Thermo Scientific revisado diciembre **2014**.

<http://www.piercenet.com/method/overview-elisa>

UNEP (United Nations Environment Programme). **(2009)**. "Supporting document for the draft risk profile on endosulfan". *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*. NEP/POPS/POPRC.5/INF/9. Disponible en:

[http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/hrPOPRCMeeti.](http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/hrPOPRCMeetings/POPRC5/POPRC5Documents/tabid/592/1anguage/fr-CH/Default.aspx)

[ngs/POPRC5/POPRC5Documents/tab id/592/1a nguage/fr-CH/Default.aspx](http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/hrPOPRCMeetings/POPRC5/POPRC5Documents/tabid/592/1anguage/fr-CH/Default.aspx)